

PRIMÄRSTRUKTUR DES KOLLAGENS
ENZYMATISCHE UND CHEMISCHE FRAGMENTIERUNG
PARTIELLE SEQUENZIERUNG
DES BROMCYANPEPTIDS $\alpha 2$ - CB 3,5

Luu Phan - Thanh

1976

PRIMÄRSTRUKTUR DES KOLLAGENS
ENZYMATISCHE UND CHEMISCHE FRAGMENTIERUNG
PARTIELLE SEQUENZIERUNG DES BROMCYANPEPTIDS Q2-CB3,5

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von
Luu Phan-Thanh
München 1975



1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin

Tag der mündlichen Prüfung: 10.5.1976

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut
für Biochemie in Martinsried bei München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K. Kühn danke ich für die wohlwollende
Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Herrn Dr. P. P. Fietzek gilt mein besonderer Dank
für seine immerwährende Bereitschaft und Tatkraft
sowie für zahlreiche anregende Diskussionen.

Herzlich möchte ich allen Freunden und Mitarbeitern
des Arbeitskreises für Ratschläge und ständige
Hilfsbereitschaft danken.

INHALTVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGEN	
A. EINLEITUNG	1
B. AUFGABENSTELLUNG	8
C. EXPERIMENTELLER TEIL	
I. Darstellung des nativen Kollagens aus der Kalbshaut	9
1. Neutralsalzlösliches Kollagen	9
2. Säurelösliches Kollagen	9
3. Bestimmung des Kollagengehaltes	10
II. Chemische und enzymatische Spaltungen	11
1. Bromcyanspaltung	11
2. Hydroxylaminspaltung	11
3. Chymotrypsinabbau	12
4. Trypsinabbau	12
III. Chromatographische Trennverfahren	12
1. Ionenaustauscherchromatographie	13
a. Chromatographie an CM-Cellulose	13
b. Chromatographie an Phosphocellulose	13
2. Molekularsiebchromatographie	14
a. Entsalzung an Bio-Gel P-2	14
b. Gelfiltration an Bio-Gel P-4	14
c. Gelfiltration an Bio-Gel A-1.5	14
d. Gelfiltration an Sephadex G-50s	15
IV. Molekulargewichtsbetimmung	15
V. Aminosäureanalyse	15
VI. Sequenzierung	16

D. ERGEBNISSE

I. Herstellung des Peptids $\alpha 2$ -CB _{3,5}	17
1. Darstellung vom löslichen, nativen Kollagen	17
2. Bromcyanabbau. Trennung der CB-Peptide	17
II. Chymotrypsinspaltung des Peptids $\alpha 2$ -CB _{3,5}	20
1. Allgemeines	20
2. Aufarbeitung der chymotryptischen Peptide	23
3. Zuordnung der chymotryptischen Peptide	35
III. Chymotryptische Nachspaltung von Peptid 3B	39
IV. Hydroxylaminspaltung	49
1. Hydroxylaminspaltung von Peptid 2A	49
2. Hydroxylaminspaltung von Peptid 3B	54
3. Hydroxylaminspaltung von Peptid 6A	59
V. Sequenzanalyse des Peptids 3B	62
1. Trypsinspaltung	62
2. Zuordnung der tryptischen Peptide.	
Partielle Sequenzanalyse von Peptid 3B	69
E. DISKUSSION	73
F. ZUSAMMENFASSUNG	82
G. LITERATUR	84

ABKÜRZUNGEN

$\alpha 2(78)$	Fragment der $\alpha 2$ -Kette, entstanden durch Kollagenasebehandlung (Länge des entsprechenden Fragments in nm)
ATP	Adenosin - 5'- Triphosphat
CB-Peptid	Bromcyan-Peptid
CM-Cellulose	Carboxymethyl-Cellulose
NLK	Neutralsalzlösliches Kollagen
PTH-Aminosäure	Phenylthiohydanthoin-Aminosäure
SLK	Säurelösliches Kollagen
SLS	Molekülzusammenlagerungen bei ATP-Fällung (Segment-long-spacing)
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanyl-Chloromethyl-Keton
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan

A. EINLEITUNG

Die meisten Proteine besitzen mehrere einander übergeordnete Strukturen. Die Identität eines Proteins hängt wesentlich von der Aminosäuresequenz seiner Peptidketten ab. Die lineare Anordnung der Aminosäurereste, d.h., die Primärstruktur des Proteins, determiniert seine höheren räumlichen Strukturen, die dem Protein seine Eigenschaften verleihen und seine biologischen Aktivitäten bestimmen.

Das Kollagen in seinen verschiedenen Formen bildet den Hauptbestandteil des Stütz- und Bindegewebes und kommt in allen mehrzelligen tierischen Organismen vor. Obwohl sich das Kollagen an der Morphogenese und an verschiedenen Regulationsmechanismen während des Wachstums und der Wundheilung beteiligt, hat es im wesentlichen eine Funktion als Stütz- und Gerüstsubstanz. Seine Bedeutung als ein strukturelles Element rührt hauptsächlich von der ungewöhnlichen mechanischen Stabilität der Kollagenfibrille her. Die Funktion und die makromolekulare Anordnung der Kollagenfaser sind verschieden je nach Art des Bindegewebes. In der Haut besteht das Kollagen aus einem dreidimensionalen Fasergeflecht, in den Sehnen ist es als parallele Faserbündel angeordnet, und im Knochen bildet das Kollagen ein loses Fasernetzwerk, in das Mineralien in der Haupt-

sache Kalziumhydroxyd und Hydroxylapatit eingelagert sind.

Die Möglichkeit, eine kleine Fraktion von Kollagen aus Geweben von jungen Tieren mit kalten Neutralsalz- oder Säurelösungen zu extrahieren, hat die Identifizierung und die detaillierte Analyse des Kollagenmonomeren erlaubt. Das Kollagenmolekül besteht aus drei Polypeptidketten mit je ungefähr 1000 Aminosäureresten. Im nativen Zustand liegt jede Kette in einer Links-schraube vor. Die drei Ketten sind seilartig um eine gemeinsame Achse zu einer Rechtsschraube verdreht. Diese von Ramachandran vorgeschlagene und von Rich und Crick verfeinerte tripelhelikale Struktur [1,2,3] bedingt die Starrheit und die stabförmige Gestalt des Kollagenmoleküls ($14 \times 2900 \text{ \AA}$) und wird ermöglicht durch das Auftreten von Glycin an jeder dritten Stelle in der Sequenz und durch den hohen Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin (20% der gesamten Aminosäurereste).

Die Helices der einzelnen Ketten sind durch Wasserstoffbrücken zwischen Amid- und Carbonylgruppen der Peptidbindungen benachbarter Ketten und durch die stereochemischen Eigenschaften der Iminosäurereste stabilisiert [4,5].

An den Amino- und Carbonylenden der Ketten befinden sich kurze, nicht tripelhelikale Bereiche, in denen Glycin nicht in jeder dritten Position vorkommt.

Die Sequenzanalyse hat in der Tat gezeigt, daß die Peptidkette des Kollagens aus Triplets Gly-X-Y besteht. Ein wichtiges weiteres Merkmal der Aminosäuresequenz des Kollagens ist die charakteristische Verteilung der polaren geladenen Aminosäuren entlang der Peptidkette. Entlang der Kette wechseln sich polare und apolare Bereiche ab, die sich im Elektronenmikroskop sichtbar machen lassen [6]. Gibt man ATP zu sauren Kollagenlösungen, bilden sich die "segment-long-spacing" Kristallite (SLS), in denen sich die Moleküle parallel und mit gleichen Enden abschneidend zusammenlagern. Nach Anfärbung mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat zeigen sie ein charakteristisches Querstreifungsmuster mit dunklen und hellen Banden, die die polaren und apolaren Bereiche der Sequenz des Kollagenmoleküls widerspiegeln.

Das Kollagenmolekül wird in einer Vorläuferform, dem Prokollagen synthetisiert. Das Prokollagen trägt am N- und C-terminalen Ende ein zusätzliches Peptid, dessen Struktur von der des restlichen Moleküls abweicht [7,8,9]. Die Bildung des Kollagenmoleküls aus einzelnen Polypeptidketten erfolgt in einer komplizierten Reihe von enzymatisch gesteuerten Schritten. Nach ihrer Synthese in der Zelle unterziehen sich die Polypeptidketten mehreren posttranslationalen Veränderungen: Hydroxylierung bestimmter Prolin- und

Lysinreste durch spezifische Hydroxylasen, Glykosylierung eines Teils der Hydroxylysinreste durch Galaktosyl- und Glukosyltransferasen. Die zusätzlichen Peptide bringen, so nimmt man an, die Ketten in den richtigen Raster für die Ausbildung der Tripelhelix [10,11], und das komplette Prokollagenmolekül wird dann in den extrazellulären Raum ausgeschieden. Erst nach der spezifischen Abspaltung der Prokollagenpeptide können sich die Moleküle zu Fibrillen zusammenlagern [12,13].

Verantwortlich für die mechanische Stabilität des Fibrillenverbandes sind die intermolekularen Quervernetzungen. Bestimmte Lysin- und Hydroxylysinreste in den nicht helikalen Bereichen an beiden Enden des Moleküls werden oxidativ desaminiert. Die resultierenden Carbonylverbindungen (Allysine bzw. Hydroxyallysine) reagieren dann mit Lysin- bzw. Hydroxylysinresten benachbarter Moleküle zu Schiff'schen Basen. Diese säureempfindliche Aldiminbindung wird erst in einem weiteren, noch unbekannten Schritt in eine stabile Form überführt. Durch Aldoladdition von einander gegenüberliegenden Allysine- bzw. Hydroxyallysinresten entsteht eine andere Art von Quervernetzung. Diese säurestabile Quervernetzungsbindung geht leicht durch Dehydratisierung in die α,β -ungesättigte Verbindung über, daran können weitere Reaktionen erfolgen und zu polyfunktionellen Quer-

vernetzungen führen [14] .

Die verschiedenen Bindegewebstypen werden aus verschiedenen, genetisch determinierten Typen von Kollagen aufgebaut. Vier Typen sind bis jetzt entdeckt worden. Am längsten bekannt und am besten untersucht ist der Kollagentyp I. Er bildet den Hauptbestandteil der Haut, der Sehnen und der organischen Substanz der Knochen. Sein Molekül besteht aus zwei α 1- Ketten und einer α 2- Kette. Das Knorpelkollagen wurde als Typ II bezeichnet. Sein Molekül enthält drei identische α 1(II)-Ketten [15] . Ebenfalls aus drei identischen Ketten besteht das Kollagen Typ III, das in der Haut, in Blutgefäßen und anderen Organen gefunden wird [16,17,18,19] . Das Kollagen von Basalmembranen wurde Typ IV genannt; sein Molekül enthält wahrscheinlich auch drei identische α 1(IV)- Ketten [20] .

Die entsprechenden Ketten vom selben Kollagentyp aus verschiedenen Species haben eine fast identische Verteilung der Methioninreste entlang der Kette. Die Anwendung der Bromcyanspaltung nach Gross und Witkop am Kollagen [21] führte für jede Kette zu einem charakteristischen Bromcyanpeptidmuster. Die Bromcyanspaltung der sieben Methioninreste enthaltenden α 1-Kette des Kalbshautkollagen führt zu acht CB-Peptiden [22,23]. Die vier Methioninreste enthaltende α 2-Kette ergibt fünf CB-Peptide [24] ,

wovon $\alpha 2$ -CB_{3,5} mit 662 Aminosäureresten das größte ist.

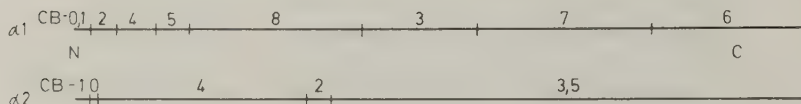


Abb. 1: Schematische Darstellung der CB-Peptide der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette von Kalbshautkollagen.

Die Untersuchung der Primärstruktur eines Proteins geht in zwei Stadien vor sich: erstens Fragmentierung der Peptidketten in geeignete, kleinere Peptide und zweitens Aufklärung der Aminosäuresequenz innerhalb dieser kleineren Peptide. Die Anwendung des Bromcyanabbaus hat sich als ein besonders wertvolles Hilfsmittel für die Fragmentierung erwiesen. Da einige der resultierenden Peptide noch verhältnismäßig groß sind, muß dieser Abbau durch weitere spezifische Spaltungen ergänzt werden.

Die Aminosäuresequenz vom Kollagen ist seit fünf Jahren gründlich untersucht worden. Große Fortschritte wurden durch die Einführung des automatisierten Edman-Abbaues erzielt. Die bisherigen Arbeiten haben uns fast die gesamte Sequenz der 1052 Aminosäurereste langen $\alpha 1(I)$ -Kette des Kalbshautkollagen [25, 26, 27, 28] und ungefähr ein Drittel der Sequenz der 1024 Aminosäurereste langen $\alpha 2$ -Kette gebracht.

Von der $\alpha 2$ -Kette bekannt sind die Sequenzen der CB-Peptide $\alpha 2$ -CB1, $\alpha 2$ -CB0 [29], $\alpha 2$ -CB4 [30], $\alpha 2$ -CB2 [31] und kurze Bereiche des Peptids $\alpha 2$ -CB3,5, darunter den N-terminalen Bereich mit 36 Resten. Zwei durch Kollagenasebehandlung des nativen Kollagenmoleküls erhaltene Fragmente $\alpha 2(125)$ und $\alpha 2(78)$ [32] und 4 chymotryptische Peptide von $\alpha 2$ -CB3,5 [33] wurden isoliert und zugeordnet.

Die Auswertung der Aminosäuresequenz der $\alpha 1(I)$ -Kette im Bezug auf höhere Strukturen des Kollagens hat folgendes ergeben: Die Aggregation der Kollagenmoleküle zu den nativen Fibrillen wird durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Kollagenmolekülen gesteuert. Die polaren geladenen sowie die hydrophoben Aminosäuren sind entlang der Peptidkette so verteilt, daß eine maximale Wechselwirkung bei einer Versetzung der Moleküle um 670 Å gegeneinander stattfindet. In dieser Auswertung wurde die $\alpha 2$ -Kette noch nicht einbezogen. Die bisher bekannten Sequenzdaten sowie das elektronenmikroskopische Bild der SLS zeigen, daß die Verteilung von polaren Aminosäuren der $\alpha 2$ -Kette der der $\alpha 1$ -Kette homolog ist. Die $\alpha 2$ -Kette besitzt aber einen wesentlich höheren Gehalt an hydrophoben Aminosäuren, die anders verteilt zu sein scheinen wie bei der $\alpha 1$ -Kette. Die Rolle der hydrophoben Seitenketten bei der Aggregation der Moleküle wird man erst nach Aufklärung der $\alpha 2$ -Kette deuten können.

B. A U F G A B E N S T E L L U N G

Das Typ I - Kollagen besteht aus zwei $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Kette. Den letzten, noch nicht aufgeklärten Bereich der Primärstruktur des Kollagens stellt das 662 Aminosäurereste enthaltende C-terminale Bromcyanpeptid $\alpha 2$ -CB3,5 dar.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, im Hinblick auf eine vollständige Sequenzanalyse, sowohl die Fragmentierung des Peptids $\alpha 2$ -CB3,5 in kleinere Bruchstücke als auch deren Sequenzierung durchzuführen.

Zur Fragmentierung sollten enzymatische und chemische Methoden angewandt werden. Die Bedingungen sollten so gewählt werden, daß die entstehenden Peptide sich möglichst optimal zur Sequenzierung mit dem automatisierten Edman-Abbau eignen.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Darstellung des nativen Kollagens aus der Kalbshaut

Der Mittelspalt frischer Kalbshaut wurde mit Eis im Fleischwolf zerkleinert und mit Eiswasser gewaschen. Alle weiteren Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt, die Zentrifugation erfolgte bei 20 000 x g, allen Lösungen wurden kleine Mengen von Toluol zugesetzt.

1. Neutralsalzlösliches Kollagen (NLK)

Die zerkleinerte und gewaschene Haut wurde 48 h mit dem 10- fachen Volumen einer 1M NaCl - Lösung (0,05 M Tris, pH 7,5) extrahiert [34]. Der Brei wurde zentrifugiert, das NLK aus dem Überstand durch Zugabe von festem NaCl auf etwa 20 % (Gew./Vol.) gefällt, das Präzipitat mit 20 % NaCl - Lösung gewaschen und in 0,5 M Essigsäure wieder gelöst. Die saure Lösung wurde zentrifugiert und das NLK nochmals durch Zugabe von NaCl auf etwa 5 % ausgefällt. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde in 0,05 M Essigsäure gelöst und die Lösung 4 Tage gegen 0,05 M Essigsäure dialysiert. Der Rückstand der ersten Extraktion wurde nochmals in gleicher Weise behandelt. Das so erhaltene Kollagen wurde lyophilisiert und in dem Zustand aufbewahrt.

2. Säurelösliches Kollagen (SLK)

Die zerkleinerte frische Kalbshaut wurde über Nacht un-

ter Rühren einmal mit einer 0,5 M Natriumacetatlösung (10- faches Volumen), und zweimal mit Wasser gewaschen und danach 2 Tage der Extraktion mit dem 10- fachen Volumen an 0,5 M Citratpuffer, pH 3,7 unterworfen. (Citratpuffer: 10,5 g Zitronensäure (H_2O) krist., 50 ml 1 N HCl, 100 ml 1 N NaOH auf 1 l) [35] .

Zur Herstellung des Citratextraktes wurde auch der Rückstand des Neutralsalzextraktes verwendet.

Das citratlösliche Kollagen wurde durch Zugabe von NaCl auf 5 % gefällt und wie NLK gereinigt. Der in Citratpuffer unlösliche, mit Wasser gewaschene Rückstand wurde mit dem 20- fachen Volumen 0,5 % Essigsäure 2 Tage extrahiert und der Essigsäureextrakt wie der Citratextrakt weiter behandelt.

3. Bestimmung des Kollagengehaltes

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die spezifischen optischen Drehwerte des Kollagens bei $\lambda = 405$ nm herangezogen $[\alpha]_{405} = - 1040^\circ$ für natives,
 $= - 360^\circ$ für denaturiertes Kollagen.

Die Messung wurde mit einem photoelektrischen Präzisionspolarimeter der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, durchgeführt.

II. Chemische und enzymatische Spaltungen

1. Bromcyanspaltung

Eine konzentrierte Kollagenlösung (bis zu 10 mg/ml,) in 0,1 M Essigsäure, ggfs. in 4 M Harnstoff wurde 30 min. bei 40 - 45°C denaturiert, nach Abkühlen auf 20°C mit 6 N HCl tropfenweise auf pH 1 - 1,5 eingestellt [23].

Der Ansatz wurde mit N₂ gesättigt, mit einer gleichen Menge durch Sublimation gereinigten Bromcyans (100-facher molarer Überschuß, bezogen auf Methioninreste) versetzt und 4 h bei 30°C abgebaut. Das Bromcyan wurde durch Entsalzung an Bio - Gel P-2 (100 - 200 mesh) entfernt.

2. Hydroxylaminspaltung

Die Hydroxylaminspaltung wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von Bornstein [36] durchgeführt. 3,43 g Hydroxylaminhydrochlorid (getrocknet und bei 4°C unter Vakuum aufbewahrt) werden in ein gekühltes Glas eingewogen und in 13 ml kaltem Wasser gelöst. 2,5 ml 12,5 N NaOH (50 %) wurden tropfenweise unter kräftigem Rühren zugefügt, ebenso 5 ml 1 M K₂CO₃ und der pH mit 6 N HCl auf 9 eingestellt. 10 ml dieser frisch zubereiteten Lösung wurden zu 20 - 40 mg Protein gegeben, das Glas verschlossen und 2 h bei 45°C inkubiert. Danach wurde der pH mit 6 N HCl auf 4 erniedrigt und die Mischung entsalzt.

3. Chymotrypsinabbau [37]

Das Peptid wurde in 0,2 M NH_4HCO_3 , pH 7,8 gelöst (5 - 10 mg Peptid pro ml). Die Enzymlösung 1 mg α -Chymotrypsin (Worthington, USA, CDJ 11C, 48,8 U/mg) in 1 ml 0,001 M CaCl_2 , 0,001 N HCl wurde in einem Enzym : Substrat-Verhältnis von 1 : 50 zugegeben und die Ansätze zwei, acht, bzw. 40 min. bei 37°C inkubiert. Der Abbau wurde durch Abkühlen und Zusatz von Eisessig bis pH 3 - 3,5 gestoppt. Das Peptidgemisch wurde bei Zimmertemperatur entsalzt und lyophilisiert.

4. Trypsinabbau

Die Bedingungen waren die gleichen wie beim Chymotrypsinabbau, nur betrug die Inkubationszeit 4 h. Verwendet wurde das Trypsin der Firma Worthington, USA (TPCK, 2 mal krist.)

III. Chromatographische Trennverfahren

Jede verwendete chromatographische Trenneinheit bestand aus einer Chromatographiesäule mit Pumpe (Perpex, LKB, Schweden), einem Spektralphotometer (Beckman DB oder Hitachi 181) mit Schreiber und Fraktionssammler (Radi Rac, Ultrorac, LKB, Schweden). Alle Eluate wurden kontinuierlich mit einem Spektralphotometer gemessen und aufgezeichnet.

1. Ionenaustauscherchromatographie

a) Chromatographie an Carboxymethylcellulose

Die Trennung der CB-Peptide erfolgte durch Chromatographie an CM-Cellulose (CM 52, Microgranular, Whatman, USA) in einer auf 40°C thermostatisierten Säule. Die Füllhöhe der Säule betrug für den präparativen Zweck etwa 30 cm bei einem Durchmesser von 5 cm. Die Durchflußgeschwindigkeit war 380 - 400 ml/h. Die Säule wurde mit 0,04 M NaCl enthaltendem 0,02 M Citratpuffer, pH 3,6 äquilibriert. Die Elution erfolgte in 0,02 M Citratpuffer pH 3,6 mit einem linearen Gradienten von 0,04 bis 0,14 M NaCl in einem Gesamtvolumen von 6000 ml. Proben von 1 - 2 g CB-Peptiden wurden vor dem Auftragen in ca. 100 ml Puffer gelöst und 20 min. bei 40°C denaturiert.

b) Chromatographie an Phosphocellulose

Die Chromatographie an Phosphocellulose (Whatman P 11, fibrous powder form, USA) erfolgte an Säulen von 1,7 x 6 cm bzw. 2,3 x 20 cm, äquilibriert mit 0,001 M Natriumacetatpuffer, pH 3,8 bei 40°C mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,6 M NaCl in einem Gesamtvolumen von 1000 ml bzw. 1600 ml desselben Puffers bei Durchflüssen von 150 bzw. 200 ml/h. Proben bis 50 mg bzw. 150 mg wurden aufgetragen.

2. Molekularsiebchromatographie

a) Entsalzung an Bio-Gel P 2 (100 - 200 mesh)

Peptidlösungen wurden bei Raumtemperatur an Bio-Gel P 2 (100 - 200 mesh) der Firma Bio-Rad, USA, in 0,1 M Essigsäure entsalzt und anschließend gefriergetrocknet. Die Säulengrößen hingen von den Probenvolumina ab:

5	x 60 cm	für 150 - 200 ml Proben
3,6	x 50 cm	für 70 - 100 ml Proben
3,6	x 31 cm	für 40 - 50 ml Proben
3	x 25 cm	für 15 - 20 ml Proben.

Die Durchflußgeschwindigkeit wurde durch hydrostatische Niveaudifferenz eingestellt.

b) Gelfiltration an Bio-Gel P-4 (200 - 400 mesh)

Gemische von kleinen Peptiden wurden an Bio-Gel P-4 (200 - 400 mesh, Bio-Rad, USA) in 0,1 M Essigsäure bei Raumtemperatur chromatographiert. An der 4 x 148 cm Säule betrug der Durchfluß ca. 80 ml/h. Die Auftragsmenge war bis 60 mg.

c) Gelchromatographie an Bio-Gel A-1,5

(200 - 400 mesh, Bio-Rad, USA)

Das Verfahren war geeignet für die Trennung von Peptiden mit Molekulargewichten von 10 000 - 200 000.

Eluiert wurde bei Raumtemperatur in 1 M CaCl_2 , 0,05 M Tris/HCl- Puffer, pH 7,5 (147,02 g CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$, 6,06 g Tris, 25 % HCl bis pH 7,5 auf 1000 ml).

Die Säulenabmessungen waren:

4,5 x 160 cm bei Durchfluß von ca. 60 ml/h mit Proben
bis 200 mg

3 x 145 cm bei Durchfluß von ca. 40 ml/h mit Proben
bis 120 mg

1,5 x 118 cm bei Durchfluß von ca. 12 ml/h mit Proben
bis 30 mg

d) Gelchromatographie an Sephadex G-50 superfine
(Pharmacia, Schweden).

Das Peptidgemisch (1500 - 20000 dalton) wurde an einer
thermostatisierten Säule (2 x 140 cm) bei 37°C frak-
tioniert. Eluiert wurde mit dem gleichen Puffer wie an
Bio-Gel P-150 mit einer Durchflußgeschwindigkeit von
17 - 20 ml/h. Proben bis 60 mg wurden aufgetragen.

IV. Molekulargewichtsbestimmung [38]

Die Molekulargewichte der untersuchten Peptide wurden
durch Gelchromatographie an Bio-Gel P-150 und Sephadex
G-50s bestimmt. Zur Aufstellung der Eichkurven wurden
Kalibrierungsläufe mit bekannten Kollagenpeptiden durch-
geführt. Die Logarithmen der Molekulargewichte sind
linear proportional zu V_E/V_0 , wobei V_E das Elutionsvo-
lumen des Peptids, V_0 das Ausschlußvolumen sind.

V. Aminosäureanalyse

Je nach Molekülgröße wurden 0,1 - 0,5 mg Peptid in 1 ml
konstant siedender HCl (6N) 24 h bei 110°C unter Stick-

stoff hydrolysiert. Um eine Oxidation des Methionins [39] und die Zersetzung des Tyrosins [40] während der Hydrolyse zu verhindern, wurde 2-Mercaptoäthanol (1 : 2000) bzw. Thioglykolsäure in HCl zugesetzt. Nach der Hydrolyse wurde HCl im Vakuum entfernt. Die Analyse wurde dann im Einsäulenverfahren [41] an den automatischen Aminosäureanalysatoren Multichrom (Beckman, München) und D500 (Durrum, USA) durchgeführt.

VI. Sequenzierung

Die automatisierte Sequenzanalyse nach Edman [42] wurde am Sequencer (Beckman Instruments, USA) durchgeführt. Die Umwandlung der abgespaltenen Anilinothiazolinon-Derivate in die PTH-Aminosäuren erfolgte in 1 N HCl 10 min. bei 80°C. Die PTH-Aminosäuren wurden mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel F 254, Merck, Darmstadt) und Gaschromatographie [43] (GC - 45, Beckman Instruments, USA) identifiziert. 100 bis 500 nMol Peptid wurden eingesetzt.

D. E R G E B N I S S E

I. HERSTELLUNG DES PEPTIDS α 2-CB_{3,5}

1. Darstellung von löslichem, nativem Kollagen.

Frischer, zerkleinerter Mittelspalt der Kalbshaut wurde mit Neutralsalzlösung und saurem Citratpuffer extrahiert. Die Reinigung des neutralsalzlöslichen (NLK) und säurelöslichen Kollagens (SLK) erfolgte durch Umfällung. Salz wurde durch Dialyse gegen Essigsäure befreit. Nach polarimetrischer Messung betrug die Ausbeute der Extraktion etwa 5 % (bezogen auf das Feuchtgewicht der Haut). Aus 2 kg Mittelspalt der Kalbshaut wurden erhalten :

8 g NLK

90 g SLK (60 g aus dem 1. Citratextrakt und
30 g aus dem 2. Citratextrakt).

2. Bromcyanabbau. Trennung der CB-Peptide.

Das NLK bzw. SLK wurde bei 40°C denaturiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und 4 Stunden bei 30°C mit Bromcyan inkubiert. Nach der Reaktion wurde das Bromcyan durch Entsalzen an Bio-Gel P-2 entfernt. Die Trennung der CB-Peptide erfolgte durch Chromatographie an CM-Cellulose in Citratpuffer pH 3,6. Abbildung 2 zeigt ein typisches Chromatogramm von dieser Auftrennung. Das Peptid α 2-CB_{3,5} erschien bei Hoher Ionenstärke in Peak g. Diese Fraktion g wurde nach Entsalzung und Gefriertrocknung durch Chromatographie an Bio-Gel A 1.5 (Abb. 3) und anschließend

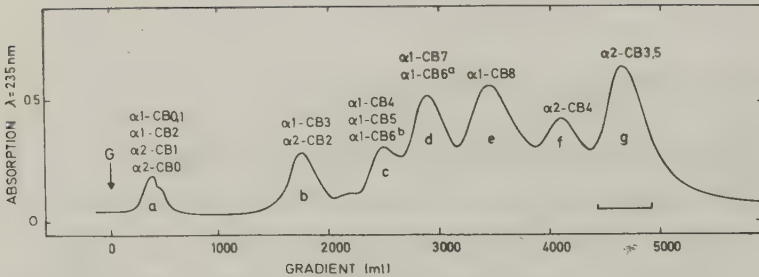


Abb. 2: Trennung der CB-Peptide von säurelöslichem Kollagen auf CM-Cellulose bei 40°C in 0,02 m Natriumcitrat pH 3,6 mit einem Gradienten von 0,04 - 0,14 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 6000ml. Säule : 5 x 30 cm. Aufgetragene Menge: 2 g. (↓) Beginn des Gradienten.

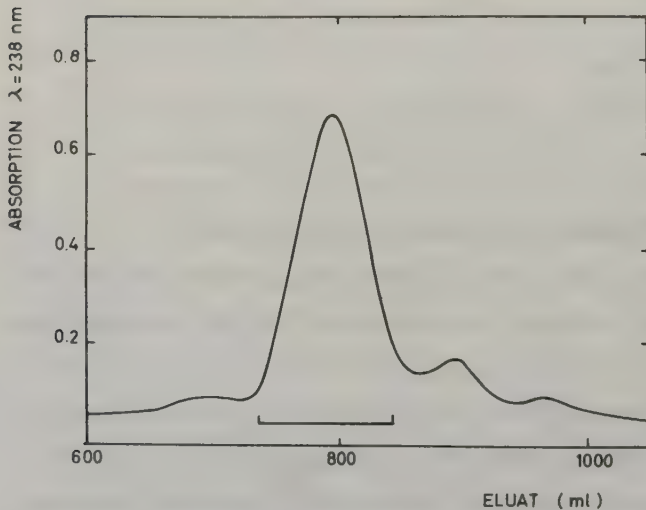


Abb. 3: Rechromatographie der Fraktion g von Abb. 2 an Agarose in 1 m CaCl_2 -Puffer pH 7,5 bei Raumtemperatur. Säule: 3 x 145 cm. Aufgetragene Menge: 120 mg.

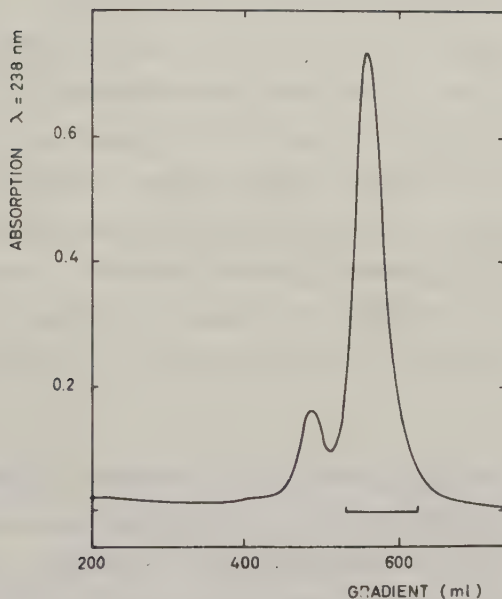


Abb. 4: Rechromatographie der Hauptfraktion von Abb. 3 an Phosphocellulose bei 40°C in 0,001 m Natriumacetat pH 3,6 mit einem Gradienten von 0 - 0,6 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 800 ml. Säule: 2,3 x 10 cm. Aufgetragene Menge: 150 mg.

an Phosphocellulose (Abb. 4) gereinigt.

Von 126 g mit Bromcyan abgebautem Kollagen wurden nach der Trennung an CM-Cellulose 16,7 g und nach der Reinigung an Bio-Gel A 1,5 und Phosphocellulose 8,3 g α 2-CB 3,5 erhalten. Das entspricht etwa 25 % der theoretischen Ausbeute.

Die Aminosäurezusammensetzung des Peptids α 2-CB3,5 ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Das NLK enthielt überwiegend α -Komponenten, während eine zunehmende Menge an Polymeren in den Citratextrakten beobachtet wurde. Eine Kettentrennung als Vorstufe für die Herstellung des $\alpha 2$ -CB_{3,5} erwies sich als nicht notwendig, weil alle CB-Peptide der $\alpha 1$ -Kette bei der Chromatographie an CM-Cellulose von Peptid $\alpha 2$ -CB_{3,5} gut abgetrennt waren. Außerdem wurde das Peptid $\alpha 2$ -CB_{3,5} noch an zwei weiteren Chromatographiesystemen gereinigt, um es von anderen contaminierenden CB-Peptiden zu befreien.

Für die Fragmentierung des 662 Aminosäurereste langen Peptids $\alpha 2$ -CB_{3,5} wurden folgende Wege eingeschlagen : durch kurze Zeit - Spaltung mit Chymotrypsin wurde verhältnismäßig übersichtliches Peptidgemisch erhalten, welches durch Kombination von Molekularsieb- und Ionenaustauscherchromatographie aufgetrennt werden konnte. Zur Nachspaltung der so erhaltenen Peptide wurde verwendet eine zusätzliche Spaltung mit Chymotrypsin, mit Hydroxylamin, oder mit Trypsin.

II. CHYMOTRYPSINSPALTUNG DES PEPTIDS $\alpha 2$ -CB_{3,5}.

1. Allgemeines.

Das Chymotrypsin spaltet vorwiegend die Peptidbindungen, an denen die Carboxylgruppen von Leucin, Phenylalanin

und Tyrosin beteiligt sind. Die Peptidbindungen, die den Iminostickstoff des Prolins bzw. des Hydroxyprolins enthalten, werden nicht gespalten.

Übliche Inkubationszeiten von einigen Stunden führten zu einer zu großen Anzahl von Bruchstücken, die durch Isolierung, Charakterisierung und Zuordnung kaum möglich erschienen. Erst eine Verkürzung der Inkubationszeit bis auf 2 Minuten ergab eine übersichtliche Zahl an Bruchstücken.

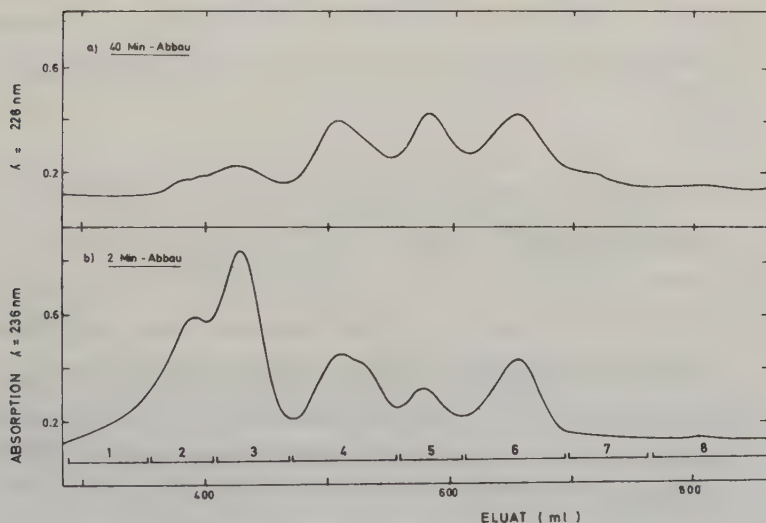


Abb. 5: Trennung der chymotryptischen Peptide (40 min- und 2 min-Abbau) von $\alpha 2\text{-CB}_{3,5}$ an Bio-Gel P-150 in 0,03 m Natriumacetat pH 3,8 bei 37°C. Säule: 3 x 143 cm. Durchfluß 22 ml/h. Aufgetragene Menge: a) 20 mg, b) 100 mg.

Abbildung 5 zeigt die Auftrennung an Bio-Gel P-150 von einem 40 Minuten- und 2 Minuten-Abbau. Man sieht, daß im Vergleich zum 2 Minuten-Abbau die ersten Peaks beim 40 minuten-Abbau zugunsten der letzten Peaks wesentlich verkleinert sind. Das deutet darauf hin, daß die großen Fragmente bei längerer Abbauzeit weiter gespalten wurden.

Jede der acht Fraktionen des nach 2 Minuten erhaltenen Abbaugemisches wurde am Molekularsieb (Bio-Gel P-150) und am Ionenaustauscher (Phosphocellulose) weiter aufgetrennt. Die Reinigung der Peptide erfolgte anschließend durch Rechromatographie an gleichen Chromatographiesystemen.

Die Molekulargewichte der Peptide wurden durch Chromatographie an einer Bio-Gel P-150 - Säule, die mit bekannten Kollagenpeptiden kalibriert wurde, bestimmt (Abb. 6). Die Peptide wurden außerdem durch Aminosäurezusammensetzung und N-terminale Sequenzanalyse weiter charakterisiert. Für die Untersuchung der chymotryptischen Peptide wurden insgesamt 3 g des Peptids $\alpha 2$ -CB3,5 verwendet.

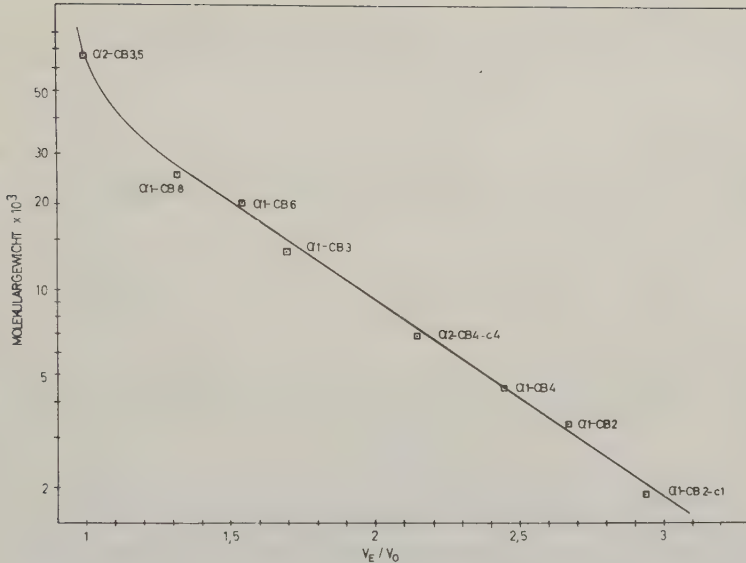


Abb. 6: Eichkurve zur Molekulargewichtsoestimmung der Peptide an Bio-Gel P-150. Aufgetragen ist der Logarithmus des Mol-gew. gegen das relative Elutionsvolumen V_E / V_0 . V_E = Elutionsvolumen, V_0 = Ausschlußvolumen. $\square$: EichPeptid

2. Aufarbeitung der chymotryptischen Peptide.

Fraktion 1 : Die Fraktion 1 von Abb.5b enthält die größten Fragmente des Peptids $\alpha 2$ -CB3,5. Drei Peptide 1A, 1B und 1C wurden durch Chromatographie der Fraktion 1 an Phosphocellulose isoliert (Abb. 7). Die Molekulargewichte und Aminosäurezusammensetzung dieser Peptide sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Das Peptid 1A hat am terminalen Ende die gleiche Sequenz wie das später beschriebene Peptid 6A (Fraktion 6).

	$\alpha 2$ -CB _{3,5}	1A	1B	1C	2A	3B
Hyp	51	30	31	35	20	20
Asp	35	13	17	22	11	17
Thr	11	6,8	9	8,3	9,4	-
Ser	21	14	14	17	14	7,7
Glu	50	26	29	32	20	16
Pro	81	46	53	60	38	29
Gly	220	116	131	152	95	82
Ala	91	48	49	55	34	24
Val	18	7,3	5,6	14	5,7	8,5
Ile	13	4,4	6	4,3	4,7	3,4
Leu	20	8,1	9,1	11	6,4	8,8
Tyr	2	-	0,7	0,6	-	1,8
Phe	9	3,9	4,8	3,7	3	2,4
Hyl	5,3	3,2	3,3	4,7	2,7	2,5
His	6	-	1,6	2	-	4,7
Lys	15	7	9	8,2	5,8	3,5
Arg	34	17	20	24	16	12
Summe	662	349	394	454	285	245
Mol.gew.	60000	35000	37000	42000	26000	22000

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung des Peptids $\alpha 2$ -CB_{3,5} und der chymotryptischen Peptide 1A, 1B, 1C, 2A, und 3B.

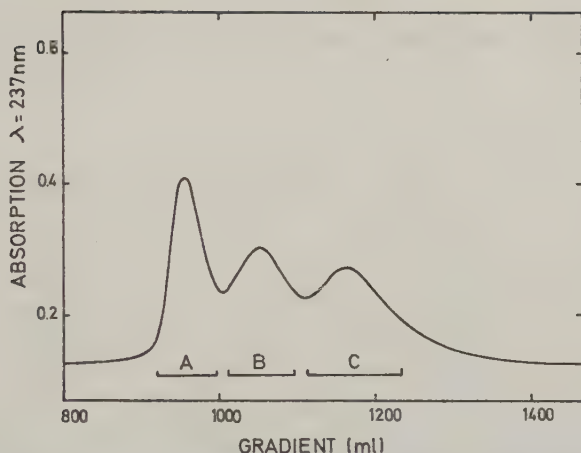


Abb. 7: Chromatographie der Fraktion 1 von Abb. 5b an Phosphocellulose in 0,001 m Natriumacetat pH 3,6 mit einem Gradienten von 0 - 0,6 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 1600 ml bei 40°C. Säule: 2,3 x 19 cm. Aufgetragene Menge: 150 mg .

Die N-terminale Sequenz des Peptids 1B ist mit der des unten beschriebenen Peptids 2A (Fraktion 2) identisch. Das Peptid 1C wurde nicht weiter untersucht.

Fraktion 2 : Die Chromatographie der Fraktion 2 an Phosphocellulose ergab eine Hauptkomponente 2A und zwei Nebenkompontenten 2B und 2C (Abb. 8). Die Réchromatographie an Bio-Gel P-150 zeigte 2A als ein einheitliches Peptid, dessen Molekulargewicht und Aminosäurezusammensetzung in Tabelle 1 angegeben sind.

2B und 2C stammten aus den Fraktionen 1 und 3 .

Das Peptid 2A enthält bemerkenswert kein Tyrosin, hat aber einen verhältnismäßig hohen Gehalt an Threonin.

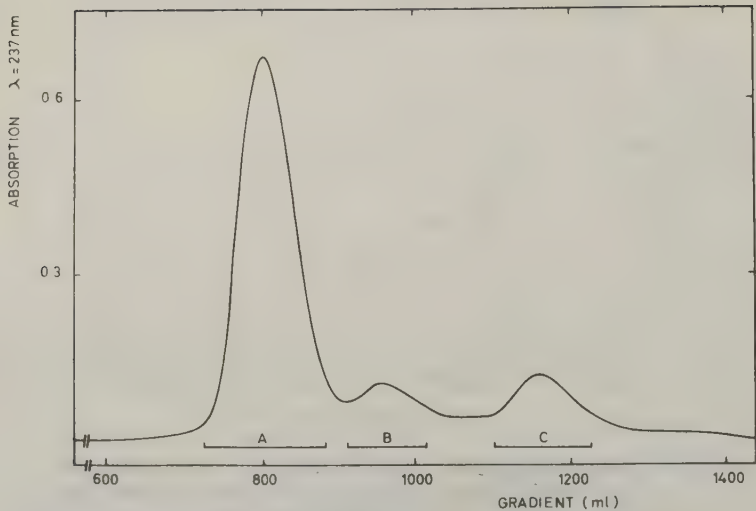


Abb. 8: Chromatographie der Fraktion 2 von Abb. 5b
an Phosphocellulose unter gleichen Beding-
ungen wie in Abb. 7.
Aufgetragene Menge : 160 mg.

Die Sequenz seiner ersten 45 N-terminalen Aminosäure-
reste wurde ermittelt :

Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Glu-Arg-
Gly-Pro-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-Ala-Ala-Gly-Pro-Thr-
Gly-Pro-Ile-Gly-Ser-Arg-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Hyp-
Gly-Ala-Asp-Gly-Asn-Lys-Gly-Glu-Ala.

Fraktion 3 : Die Fraktion 3 enthielt zwei Komponenten 3A und 3B, die an Phosphocellulose gut getrennt waren (Abb. 9).

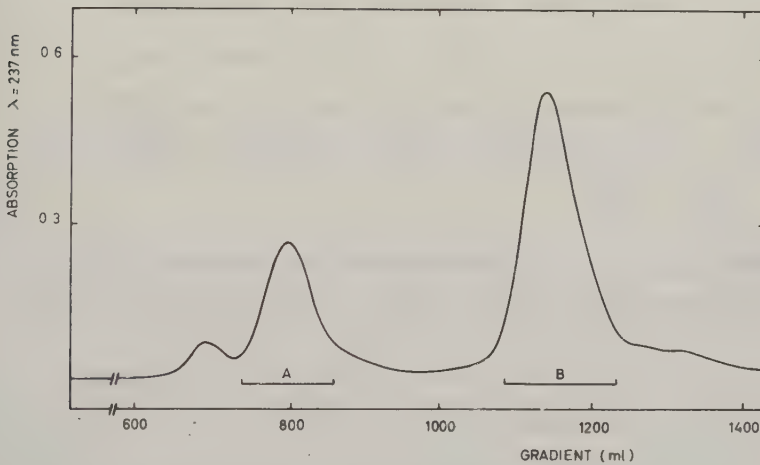


Abb. 9: Chromatographie der Fraktion 3 von Abb. 5b an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7
Aufgetragene Menge : 120 mg

Die Komponente 3A war nach Rechromatographie an Bio-Gel P-150 uneinheitlich und wurde nicht weiter verwendet, während sich die Komponente 3B als einheitlich mit dem Molekulargewicht 22000 erwies.

Wie die Aminosäureanalyse zeigte (Tab. 1), enthält das Peptid 3B kein Threonin aber beide Tyrosinreste des Peptids $\alpha 2$ -CB_{3,5}. Am N-terminalen Ende hat das Peptid 3B folgende Sequenz :

Gly-Ala-Hyp-Gly-Phe-Leu-Gly-Leu-Hyp-Gly-Ser-Arg.

Die Peptide 3B und 2A stellen die zwei wichtigste Fragmente des Peptids $\alpha 2$ -CB_{3,5} dar, die den größten Teil von $\alpha 2$ -CB_{3,5} umfassen und die später näher untersucht wurden.

Fraktion 4 : Die Chromatographie der Fraktion 4 an Phosphocellulose ergab drei Hauptkomponenten 4A, 4B

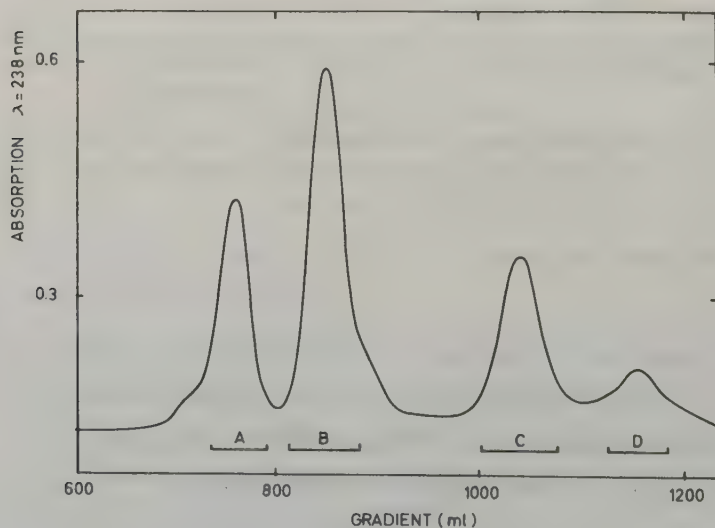


Abb. 10: Chromatographie der Fraktion 4 von Abb. 5b an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7. Aufgetragene Menge: 150 mg

	4A	4B	4C	4D	5A	5B	5C
Hyp	9	11	9	12	8	10	9,2
Asp	4,2	7,4	7	9,6	3,5	8,6	8,7
Thr	6,3	2,6	-	0,4	3,1	-	-
Ser	6,6	7	5	3,1	6	2,7	3
Glu	10	11	9	8,6	7,4	7,5	6,8
Pro	22	15	21	15	14	9,4	9,4
Gly	47	47	46	46	36	36	34
Ala	16	18	14	14	13	10	9
Val	2,7	2,1	4,6	6,6	2	5,8	5,6
Ile	1,3	4	2	1,6	2,4	1,1	1,3
Leu	3,2	3,4	4	4,4	3,2	5	3,6
Tyr	-	-	1,1	0,9	-	0,7	0,6
Phe	1,6	1,4	1,3	0,9	-	1,2	0,8
Hyl	2,1	0,6	2,7	2,3	1,4	0,3	-
His	-	-	2,2	1,5	-	1,8	1,6
Lys	2,7	3,5	2,1	1,8	3	2	2,4
Arg	7,2	8,4	6,5	8,3	4,7	6,3	6
Summe	142	143	137	137	108	108	102
Mol-gew.	13500	13500	12000	12000	9500	9500	9500

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung der chymotryptischen Peptide 4A, 4B, 4C, 4D, 5A, 5B und 5C.

und 4C und eine Nebenkompente 4D (Abb. 10), deren Molekulargewichte und Aminosäurezusammensetzung in Tabelle 2 wiedergegeben sind.

Vom Peptid 4A wurde eine N-terminale Sequenz von 20 Resten ermittelt :

Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly-Gln-Hyp-Gly-Ala-Hyl-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Lys-Gly.

Das Peptid 4B hat den gleichen N-Terminus wie das Peptid 2A.

Das Peptid 4C hat folgende N-terminale Sequenz :

Gly-Asn-Arg-Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Ser

Das Peptid 4D hat den gleichen N-Terminus wie das Peptid 3B.

Fraktion 5: Die Fraktion 5 bestand wie die Chromatographie an Phosphocellulose zeigte (Abb. 11), aus fünf Komponenten. Die drei mengenmäßig wichtigsten 5A, 5B und 5C wurden untersucht. Nach der Rechromatographie am Molekularsieb haben sie alle mit 9500 etwa dasselbe Molekulargewicht. Die Aminosäurezusammensetzung dieser Peptide ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die Sequenzanalyse zeigte, daß das Peptid 5A den gleichen N-Terminus wie das Peptid 2A und das Peptid 5B den gleichen N-Terminus wie das Peptid 3B

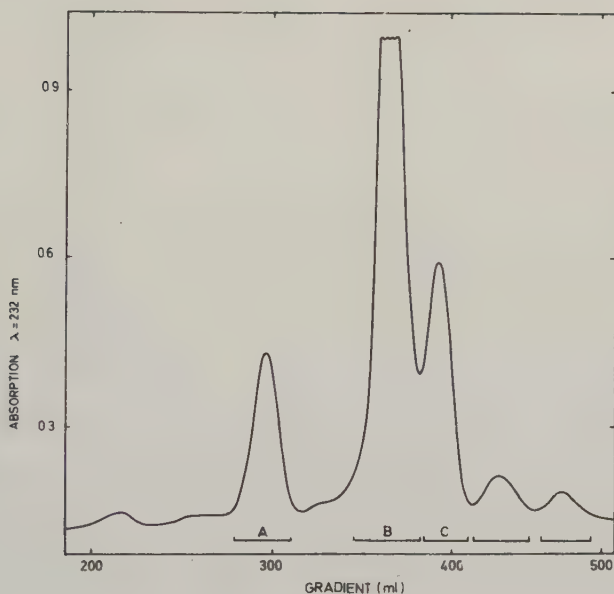


Abb. 11: Chromatographie der Fraktion 5 von Abb. 5b an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7.
Aufgetragene Menge: 120 mg.

besitzen . Das Peptid 5C ist am N-terminalen Ende sechs Aminosäurereste kürzer als das Peptid 5B.

Fraktion 6: Die Chromatographie der Fraktion 6 an Phosphocellulose ergab zwei Hauptkomponenten 6A und 6B und mehrere Nebenkomponten (Abb. 12). Nur die beiden Hauptkomponenten wurden weiter untersucht. Sie sind einheitliche Peptide und haben das Molekulargewicht 5700 (6A) und 6200 (6B). Die Aminosäurezusammensetzung

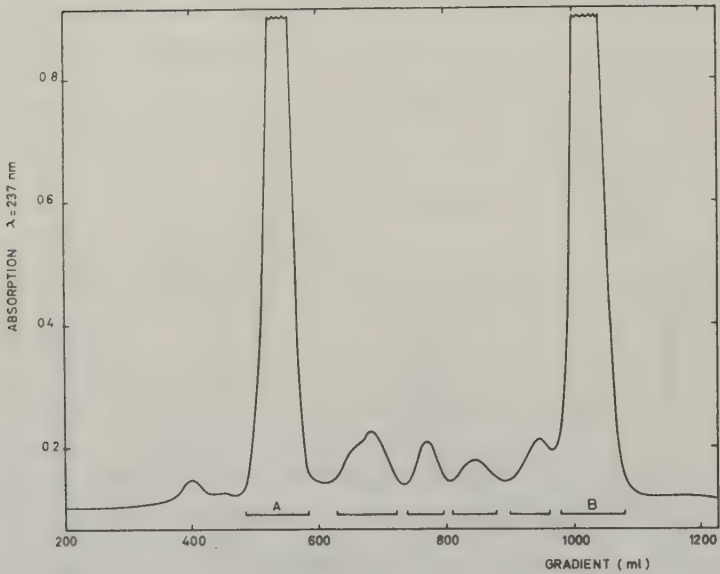


Abb. 12: Chromatographie der Fraktion 6 von Abb. 5b
an Phosphocellulose unter gleichen Beding-
ungen wie in Abb. 7.
Aufgetragene Menge : 180 mg.

dieser Peptide ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Das Peptid 6A hat folgende N-terminale Sequenz :

Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Asp-Gly-Asn-Asn-
Gly-Ala-Gln-Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Gln-Gly-Val-Gln-Gly-
Glu-Lys-Gly-Glu-Gln-Gly-Pro-Ala.

Das Peptid 6B hat die gleiche N-terminale Sequenz wie das Ausgangspeptid Q2-CB3,5 :

Gly-Pro-Arg-Gly-Phe-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Asn-Ile-Gly-Pro-Ala-Gly-Lys-Glu-Gly-Pro-Val-Gly-Leu-Hyp.

Fraktionen 7 und 8: Die Fraktionen 7 und 8 enthielten zahlreiche kleine chymotryptische Bruchstücke. Abbildung 13 vermittelt einen Überblick über das komplizierte Peptidgemisch der Fraktion 7. Bisher bestand keine Notwendigkeit, alle diese kleinen Bruchstücke aufzuarbeiten. Nur der größte Peak der Abb.13 wurde untersucht. Das entsprechende Peptid 7* hat das Molekulargewicht 4000. Seine Aminosäurezusammensetzung

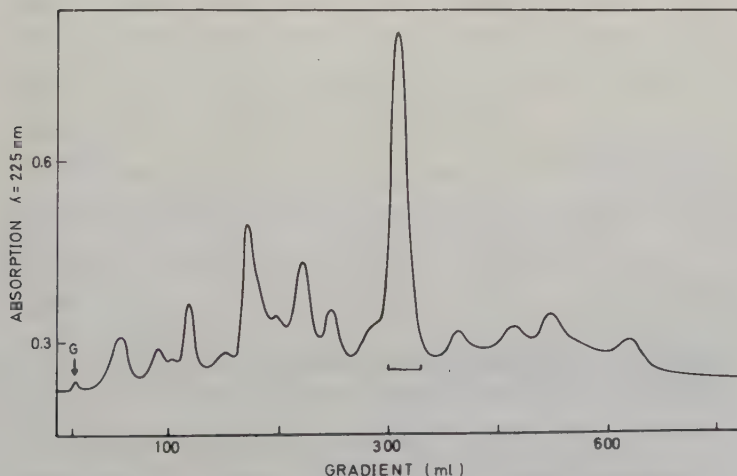


Abb. 13: Chromatographie der Fraktion 7 von Abb. 5b an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7.

ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Da es 2 bis 3 Threoninreste enthält, muß es aus dem Bereich des Peptids 2A stammen.

	6A	6B	7*
Hyp	5,7	5,1	2,8
Asp	3	4,2	1
Thr	1	-	2,5
Ser	-	3	2,6
Glu	8,2	3,3	4,7
Pro	6,3	7,8	5,3
Gly	21	23	14
Ala	8,4	5,4	2,2
Val	1,4	2	1,7
Ile	1,2	3,6	-
Leu	2,3	2,1	2,4
Phe	1,9	1,5	0,8
His	-	1,3	-
Lys	2,1	3,4	1
Arg	2,4	3	2,7
Summe	64	68	44

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung der chymotryptischen 6A, 6B und 7*.

3. Zuordnung der chymotryptischen Peptide.

Die Zuordnung der Peptide wurde möglich durch Kenntnis der Aminosäurezusammensetzung und der N-terminalen Sequenz sowohl der chymotryptischen Peptide als auch der Kollagenasefragmente $\alpha 2(190)$ -CBC, $\alpha 2(125)$ und $\alpha 2(78)$, deren Zuordnung bekannt ist.

Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung der zugeordneten Peptide.

Die zugeordneten chymotryptischen Peptide wurden entsprechend ihrer Lage entlang der Kette mit C1, C2... bis C7 numeriert. Ein Fragment, das zwei bzw. drei Bruchstücke umfaßt, wird z. B. als C3-4 bzw. C5-6-7 bezeichnet.

Zuerst wurde das 68 Aminosäurereste große Peptid 6B, das den gleichen N-Terminus wie das Ausgangspeptid $\alpha 2$ -CB3,5 hat, als C1 bezeichnet.

Das 245 Reste große Peptid 3B wurde auf Grund seiner zwei Tyrosinreste dem C-terminalen Ende zugeordnet.

Das Peptid $\alpha 2$ -CB3,5 enthält zwei Tyrosinreste. Eine frühere Untersuchung an Kollagenasefragmenten der $\alpha 2$ -Kette hat gezeigt [32], daß das Kollagenasefragment $\alpha 2(190)$ -CBC, das am Anfang des $\alpha 2$ -CB3,5 beginnt und etwa 90 Aminosäurereste vom Carboxylende des $\alpha 2$ -CB3,5 endet, nur ein Tyrosin enthält. Der zweite Tyrosinrest des $\alpha 2$ -CB3,5 muß deshalb in seinem C-terminalen Bereich liegen. Das Peptid 3B enthält beide Tyrosinreste, stellt

deshalb das C-terminale Fragment des $\alpha 2$ -CB $3,5$ dar.
Es handelt sich um das Fragment C5-6-7 (Abb. 14).

Das 285 Reste große Peptid 2A, das einen anderen N-Terminus als $\alpha 2$ -CB $3,5$ besitzt und kein Tyrosin enthält, gehört zum Mittelbereich des $\alpha 2$ -CB $3,5$. Die N-terminale Sequenz des Peptids 2A beginnt zwei Tripletts vor dem Kollagenasefragment $\alpha 2(125)$. Der Abstand vom C-terminalen Ende des Peptids 2A zum C-terminalen Ende des Peptids $\alpha 2$ -CB $3,5$ stimmt mit der Größe des Peptids 3B überein. Das Peptid 2A wurde als das Fragment C3-4 bezeichnet (Abb. 14).

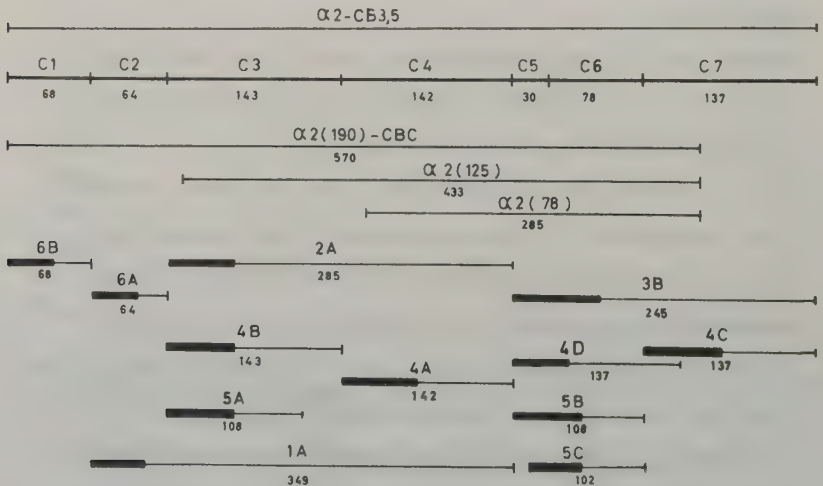


Abb. 14: Schematische Zuordnung der chymotryptischen Peptide von $\alpha 2$ -CB $3,5$.
— : Sequenzierter Bereich.

Das 64 Reste große Peptid 6A paßt gut in den Bereich zwischen den Peptiden 6B (C1) und 2A (C3-4) hinein. Diese Zuordnung wird bewiesen durch die Sequenzanalyse des 350 Reste großen Peptids 1A, das die gleiche N-terminale Sequenz wie das Peptid 6A hat. Von der Aminosäurezusammensetzung her besteht das Peptid 1A aus den Peptiden 6A und 2A. Da das Peptid 2A schon zugeordnet ist, kann das Peptid 6A also nur am N-terminalen Ende von 1A liegen. Somit stellt das Peptid 6A das Fragment C2 und das Peptid 1A das Fragment C2-3-4 dar (Abb. 14).

Nach dieser Zuordnung sollte das Peptid $\alpha 2$ -CB3,5 aus den Peptiden 6B (C1), 6A (C2), 2A (C3-4) und 3B (C5-6-7) bestehen. Die Summe der Molekulargewichte und der Aminosäurezusammensetzungen dieser vier chymotryptischen Peptide stimmt innerhalb der Fehlergrenze mit dem Molekulargewicht und der Aminosäurezusammensetzung von $\alpha 2$ -CB3,5 überein.

Die anderen zusätzlich isolierten Fragmente sollten also in den vier Peptiden enthalten sein.

Nach der Aminosäurezusammensetzung setzt sich das Peptid 2A (C3-4) aus den zwei Peptiden 4A und 4B zusammen. Das 143 Reste große Peptid 4B hat den gleichen N-Terminus wie das Peptid 2A, stellt somit das Fragment C3 dar. Das 142 Reste große Peptid 4A, dessen N-Terminus 10 Reste vor dem des Kollagenasefragments $\alpha 2(78)$ beginnt, wurde als das Fragment C4 bezeichnet (Abb. 14).

Das Peptid 5A hat den gleichen N-Terminus wie das Peptid 4B, ist aber mit 108 Resten um 35 Reste kürzer.

Ähnlich ergibt die Summe der Peptide 5B und 4C das C-terminale Peptid 3B (C5-6-7). Das Peptid 5C, das denselben N-Terminus wie 3B besitzt, stellt mit seinen 108 Resten das Fragment C5-6 dar. Das 137 Reste große Peptid 4C, das einen Tyrosinrest enthält, stellt daher das C-terminale Fragment C7 dar.

Das Peptid 4D hat den gleichen N-Terminus wie 5B und ist mit 137 Resten um 29 Reste länger als das Peptid 5B.

Das Peptid 5C, das fast das gleiche Molekulargewicht wie das Peptid 5B hat und das 6 Reste nach dem Peptid 5B beginnt, ist ein verkürztes 5B (Abb. 14).

Die relativ geringen Ausbeuten an den Peptiden 4A und 4C (Abb. 10) deuten an, daß diese Peptide noch mehrere chymotrypsinempfindliche Peptidbindungen enthalten und zu kleineren Peptiden weiter abgebaut werden. Diese Peptide befinden sich offensichtlich in den noch nicht charakterisierten Fraktionen der Abbildungen 12 und 13.

III. CHYMOTRYPTISCHE NACHSPALTUNG DES PEPTIDS 3B

Das chymotryptische Fragment 3B (C5-6-7) war mit 245 Aminosäureresten für die Aufklärung seiner Sequenz noch zu groß. Um kleinere Peptide zu gewinnen, wurde das Peptid 3B mit Chymotrypsin nachgespalten. Diesmal war die Spaltung intensiver: die Inkubationszeit betrug 8 Minuten. Für die Spaltung wurden 150 mg des Peptids 3B verwendet. Das Peptidgemisch wurde an Sephadex G-50s aufgetrennt. Es ergaben sich vier große und zwei kleine Fraktionen (Abb. 15), die am Ionenaustauscher weiter aufgetrennt wurden.

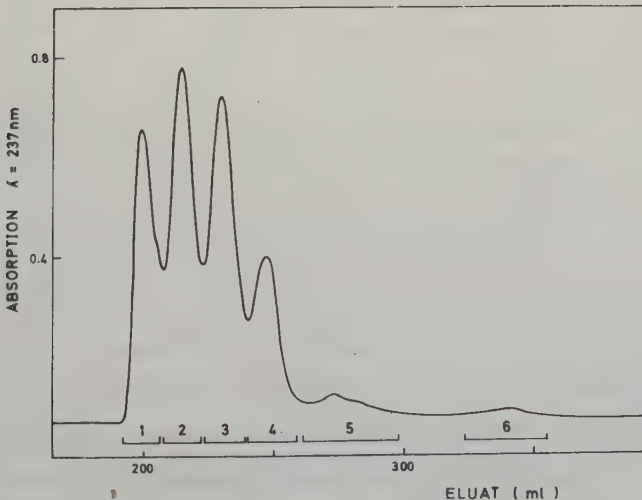


Abb. 15: Trennung der chymotryptischen Nachspaltprodukte von 3B an Sephadex G-50s in 0,03 m Natriumacetat pH 4,8 bei 38°C°. Säule: 2 x 144 cm. Aufgetragene Menge: 50 mg.

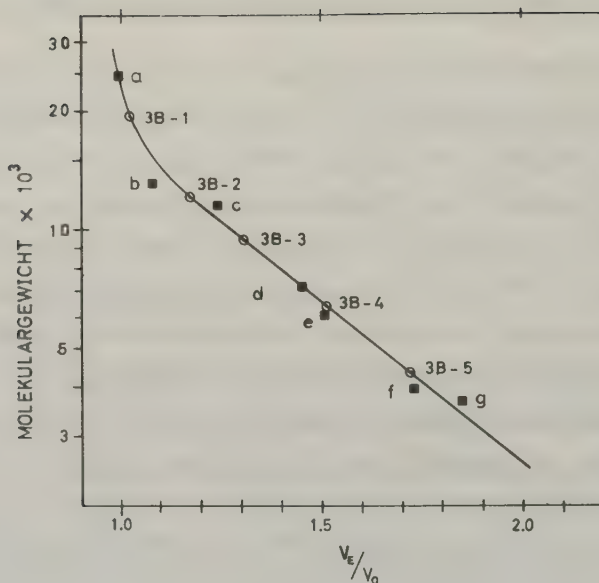


Abb. 16: Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung an Sephadex G-50s. Aufgetragen ist der Logarithmus des Mol.-gew. gegen das relative Elutionsvolumen V_E/V_0 . ■: Eichpeptide: Thermolysinpeptide von Q1-CB7, a= Q1-CB7, b= Th 3-4 (141 AS), c= Th3C4-5-6s (126 AS), d= Th4 (75AS), e= Th3 (66AS), f= Th3N (45 AS), g= Th6 (41 AS).

Die verschiedenen isolierten Peptide wurden mittels ihrer Molekulargewichte, Aminosäurezusammensetzung und N-terminale Sequenz charakterisiert. Die Molekulargewichte wurden mit Hilfe einer Eichkurve an Sephadex G-50s bestimmt (Abb. 16).

Fraktionen 1 und 2: Die in Fraktion 1 und 2 enthaltenden Peptide, 3B-1 und 3B-2, erwiesen sich bei der

	3B-1	3B-2	3B-3a	3B-3b
Hyp	16	8,6	11	10
Asp	15	7	8,6	9,4
Ser	5,7	5,2	2,9	2,7
Glu	14	9,5	6,7	6,6
Pro	27	21	9,4	9,3
Gly	72	46	36	34
Ala	22	14	9,7	9,4
Val	11	4,7	6,2	5,8
Ile	3	1,8	0,9	0,9
Leu	5	4,4	4,6	3,6
Tyr	1,6	0,6	1	0,5
Phe	1,4	1,1	0,9	-
Hyl	2,8	2,7	-	-
His	4,4	2,5	1,9	2,2
Lys	3,5	1,9	1,6	2
Arg	10	6,6	6,4	6,1
Summe	215	137	108	102
M.G.	19500	12300	9500	9300

Tabelle 4 : Aminosäurezusammensetzung der chymotryp-
tischen Peptide 3B-1, 3B-2, 3B-3a und 3B-3b.

Rechromatographie an Phosphocellulose als einheitlich.

Die Molekulargewichte und Aminosäurezusammensetzung der Peptide sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Das 215 Reste große Peptid 3B-1 enthält beide Tyrosinreste des Ausgangs-peptids 3B und einen Phenylalaninrest weniger als 3B.

Wie oben gezeigt, gibt es in der N-terminalen Sequenz von 3B einen Phenylalaninrest und kein Tyrosin. Deshalb bildet das Peptid 3B-1 ein C-terminales Fragment des Peptids 3B. Es hat folgende N-terminale Sequenz:

Gly-Ile-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Hyp

und wurde als Peptid C6-7 bezeichnet.

Das Peptid 3B-2 ist nach seiner Aminosäurezusammensetzung und seiner ermittelten N-terminalen Sequenz mit dem oben beschriebenen Peptid 4C (C7) identisch.

Fraktion 3: Die Fraktion 3 der Abbildung 15 enthielt wie die Rechromatographie an Phosphocellulose zeigte (Abb. 17), zwei Peptide 3B-3a und 3B-3b, die bei ähnlichen Ionenstärken eluiert wurden und fast das gleiche Molekulargewicht haben. Ihre Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Nach Aminosäureanalyse und N-terminaler Sequenzierung sind die Peptide 3B-3a und 3B-3b mit den oben beschriebenen Peptiden 5B bzw. 5C identisch.

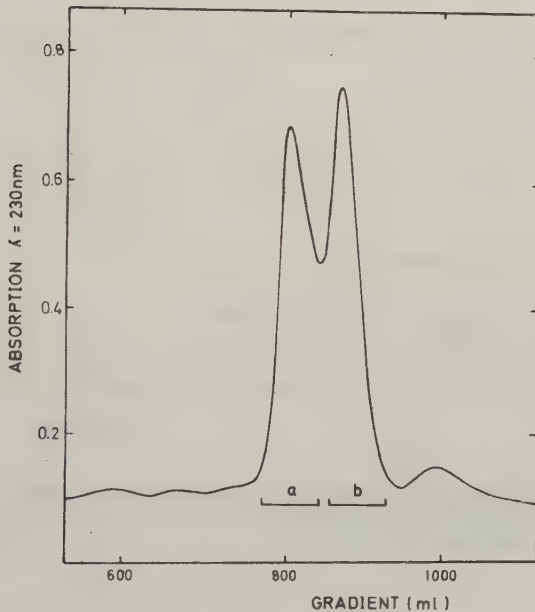


Abb. 17: Chromatographie der Fraktion 3 von Abb. 15 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb.7.

Fraktion 4: Die Chromatographie der Fraktion 4 an Phosphocellulose ergab drei Peptide 3B-4a, 3B-4b und 3B-4c (Abb. 18). Die Molekulargewichte der Peptide liegen um 7700. Die Aminosäurezusammensetzung dieser Peptide zeigt Tabelle 5.

Das Peptid 3B-4a scheint einen blockierten N-Terminus zu besitzen, da bei der Sequenzierung keine PTH- Aminosäure gefunden worden ist. Dieses Peptid wurde daher

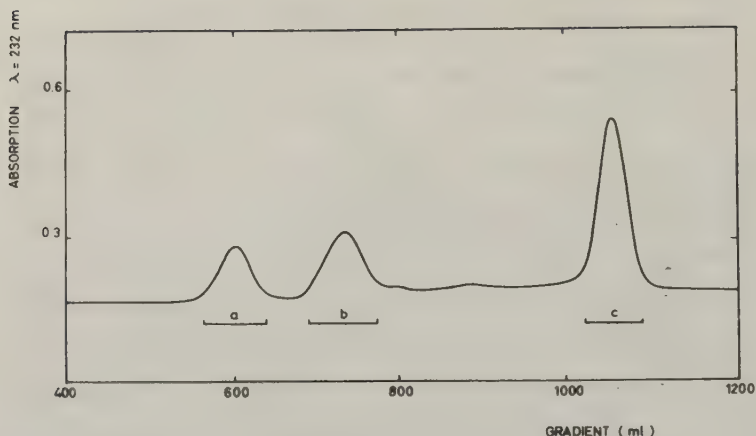


Abb. 18: Chromatographie der Fraktion 4 von Abb. 15 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7.

nicht weiter untersucht. Man kann aber annehmen, daß es dem Peptid 3B-4b in der blockierten Form entspricht.

Das Peptid 3B-4b enthält einen Tyrosin- und einen Phenylalaninrest und hat folgende N-terminale Sequenz:

Gln-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-Ala-Gly-His-His-Gly-Asp-Gln.

Diese Sequenz ist nicht identisch mit der N-terminalen Sequenz des Peptids 3B, die einen der zwei Phenylalaninreste des Peptids 3B enthält. Das Peptid 3B-4b kann deswegen nur zum C-terminalen Ende des Peptids 3B gehören.

Das Peptid 3B-4c hat die gleiche N-terminale Sequenz wie das Peptid 3B-1 und stellt mit seinen 78 Resten das Fragment C6 dar (Abb. 21).

	3B-4a	3B-4b	3B-4c	3B-5	3B-6a	3B-6b	3B-6c
Hyp	5,7	6,7	6,5	2,3	3,6	3,2	2,7
Asp	2,9	3	8,2	4,6	-	0,4	0,5
Ser	3,8	4,5	1,3	1,1	2	2	2,1
Glu	6,4	6,2	4,8	4,2	2	2,4	2,3
Pro	15	15	8,8	7,4	1,4	1,5	2,4
Gly	28	28	26	18	10	8	8
Ala	9,2	8,8	8,1	5,5	2	1,4	1,5
Val	1,3	2,7	3,5	2	2	2,5	2,3
Ile	1,4	1,2	0,9	0,6	-	-	-
Leu	2,5	2,3	0,7	2	3,5	2,5	1,8
Tyr	0,8	0,5	0,8	-	-	-	-
Phe	1,4	1,2	0,5	-	1	-	-
Hy1	-	0,7	0,6	2,2	-	-	-
His	1,7	2	1,8	0,9	-	-	-
Lys	1,3	1,3	1,4	1,6	-	-	-
Arg	3,9	2,4	4,3	3,4	1,7	2	1,9
Summe	84	84	78	53	30	25	24

Tabelle 5: Aminosäurezusammensetzung de chymotryptischen Peptide 3B-4a, 3B-4b, 3B-4c, 3B-5, 3B-6a, 3B-6b, 3B-6c.

Fraktion 5: Das Hauptpeptid 3B-5 der Fraktion 5 hat nach Rechromatographie an Phosphocellulose (Abb. 19) und Sephadex G-50s ein Molekulargewicht von 4800. Seine Aminosäurezusammensetzung zeigt Tabelle 5. Es enthält kein Tyrosin und kein Phenylalanin, hat den gleichen N-Terminus wie das Peptid 4C (C7) und ist mit 53 Resten ein N-terminales Fragment von 4C (Abb. 21).

Fraktion 6: Die Chromatographie der Fraktion 6 an Phosphocellulose ergab drei Peptide 3B-6a, 3B-6b und 3B-6c (Abb. 20). Die Molekulargewichte der Peptide liegen um 2700. Ihre Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

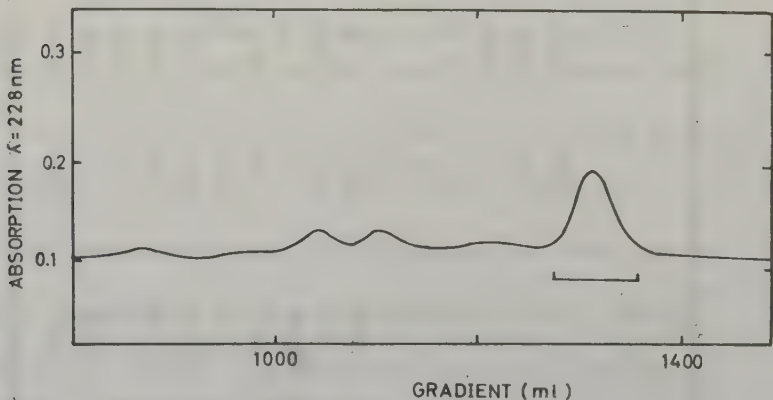


Abb. 19: Chromatographie der Fraktion 5 von Abb. 15 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7.

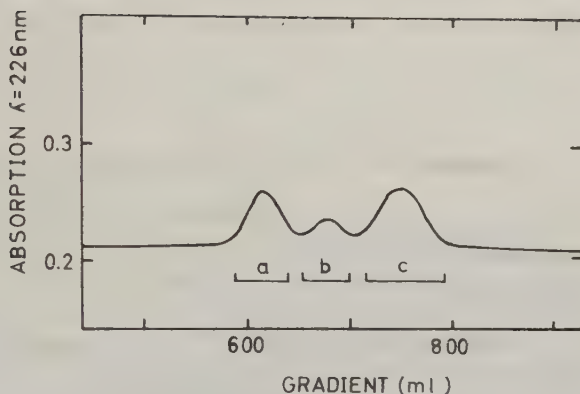


Abb. 20: Chromatographie der Fraktion 6 von Abb. 15 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie bei Abb. 7.

Das Peptid 3B-6a hat eine Aminosäurezusammensetzung, die der der ersten 30 N-terminalen Aminosäurereste des Peptids 3B entspricht. Es ist daher das Fragment C5.

Die Peptide 3B-6b und 3B-6c haben eine sehr ähnliche Aminosäurezusammensetzung. Sie unterscheiden sich vor allem durch einen Leucinrest. Man kann sich vorstellen, daß sie bei der Abspaltung des N-terminalen Pentapeptids Gly-Ala-Hyp-Gly-Phe bzw. des Hexapeptids Gly-Ala-Hyp-Gly-Phe-Leu von dem Fragment C5 entstehen.

Abbildung 21 zeigt eine schematische Darstellung der chymotryptischen Fragmente des Peptids 3B.

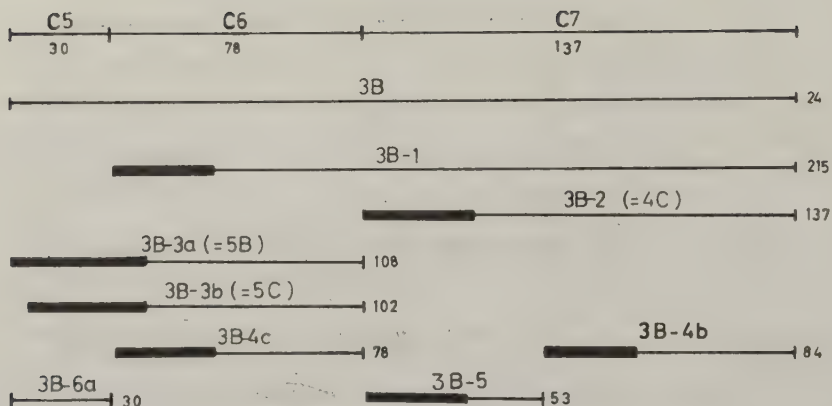


Abb. 21: Schematische Zuordnung der chymotryptischen Peptide von 3B.

Diskussion : Von den Nachspaltprodukten des Peptids 3B sind drei Bruchstücke identisch mit den bereits isolierten Peptiden aus dem 2 Minuten-Abbau des Peptids α 2-CB3,5, also 3B-2 mit 4C, 3B-3a mit 5B, und 3B-3b mit 5C. Ein dem Peptid 4D entsprechendes Bruchstück wurde nicht gefunden. Diese Bruchstücke wurden weiter in kleinere Peptide gespalten. Die Sequenzierung dieser neuen Fragmente ergab weitere Sequenzbereiche (3B-1 und 3B-4b) und drei zusätzliche Peptide (3B-6a, 3B-4c, und 3B-5). Die Nachspaltung von 3B erwies sich als eine vorteilhafte Methode, um kleinere Peptide zu gewinnen. Ihre Isolierung war einfacher als die aus dem Abbaugemisch von α 2-CB3,5.

Die kleinen Peptide können als Ausgangsmaterial für weitere Spaltungen dienen und sind damit nützlich für die vollständige Aufklärung der Sequenz des Peptids 3B.

IV. HYDROXYLAMINSPALTUNG

Hydroxylamin spaltet bei alkalischem pH die Peptidbindungen zwischen Asparagin und Glycin. Da die Hydroxylaminspaltstelle in der α 1-Kette fünf Mal und im Peptid α 2-CB₄ drei Mal auftritt, sollte auch von α 2-CB_{3,5} eine beschränkte Zahl von Asn-Gly Bindungen erwartet werden. Am Peptid α 2-CB_{3,5} angewandt, führte die Hydroxylaminspaltung allerdings zu unbefriedigenden Ergebnissen, weil ein recht kompliziertes Peptidgemisch entstand. Mit chymotryptischen Fragmenten von α 2-CB_{3,5} erwies sich die Hydroxylaminspaltung aber als eine erfolgreiche Spaltmethode. Die Methode wurde an den zwei größten Fragmenten C₃₋₄ , C₅₋₆₋₇ und dem kleinen C₂ von α 2-CB_{3,5} angewendet. Eine schematische Darstellung der isolierten und zugeordneten Hydroxylaminpeptide wird in Abb. 32 gezeigt.

1. Hydroxylaminspaltung von 2A (C₃₋₄).

40 mg des chymotryptischen Peptids 2A wurden mit Hydroxylamin, bei pH 9 zwei Stunden bei 45°C inkubiert. Nach der Entsalzung wurde das Abbaugemisch an Bio-Gel P-150 aufgetrennt (Abb. 22). Drei Fraktionen wurden gesammelt und an Phosphocellulose weiter aufgetrennt.

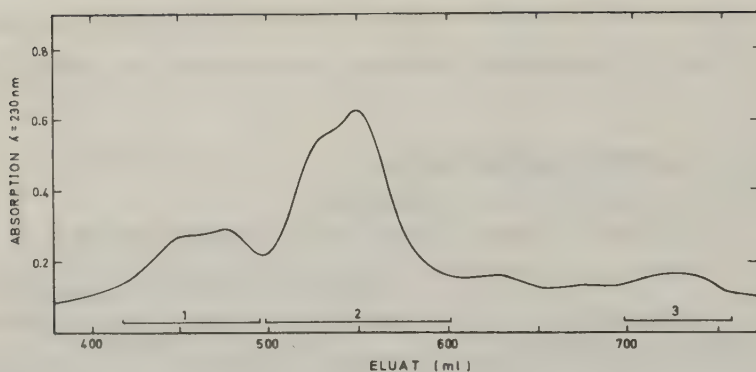


Abb. 22: Trennung der Hydroxylaminspaltprodukte von 2A an Bio-Gel P-150 unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 5. Aufgetragene Menge: 36 mg.

Fraktion 1: Die Fraktion 1 ergab an Phosphocellulose zwei Hauptkomponenten und eine Nebenkomponeute (Abb. 23). Die zwei Hauptkomponenten 2A-HA1a und 2A-HA1b wurden im gleichen System rechromatographiert. Die Molekulargewichte und die Aminosäurezusammensetzung dieser Peptide sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Fraktion 2: Die Fraktion 2 bildete die Hauptfraktion der Hydraxylaminspaltprodukte des Peptides 2A. Sie enthielt drei Peptide, 2A-HA2a, 2A-HA2b und 2A-HA2c, die durch Chromatographie an Phosphocellulose getrennt wurden (Abb. 24). Ihre Molekulargewichte und Aminosäurezusammensetzung sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

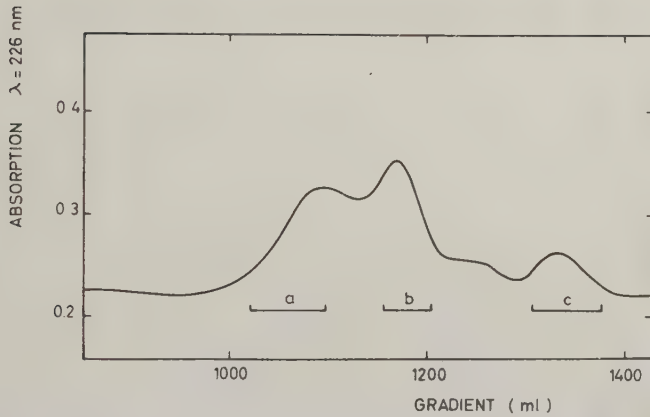


Abb. 23: Chromatographie der Fraktion 1 von Abb. 22 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7.

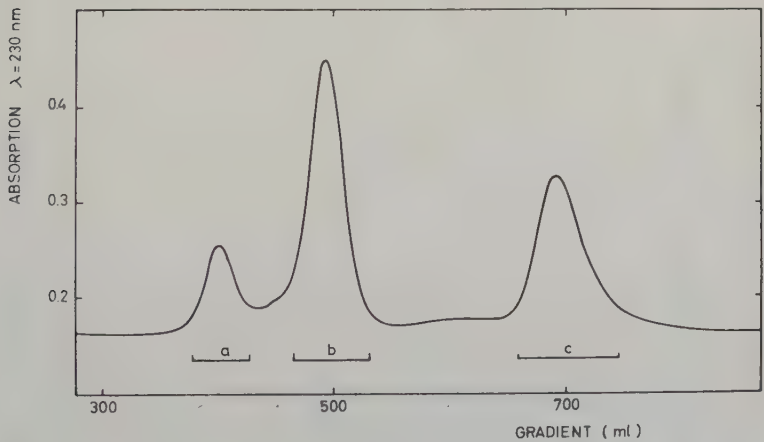


Abb. 24: Chromatographie der Fraktion 2 von Abb. 22 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7.

	2A-HA1a	2A-HA1b	2A-HA2a	2A-HA2b	2A-HA2c	2A-HA3a	2A-HA3b	2A-HA4
Hyp	5,2	7	7,4	5,8	7,6	3	1,3	-
Asp	8	8,5	2,7	2,8	5,2	2	2,4	1
Thr	6,3	5,5	5	5	3,8	1	1,2	-
Ser	6,6	8,7	5,7	6	6	3	-	1
Glu	19	15	6	7,9	5,2	3	3,6	1
Pro	13	12	17	9	12	7	7,3	-
Gly	58	56	33	33	37	13	13	2
Ala	29	24	8,4	10	14	5,2	6,4	-
Val	3,5	3,4	3,1	2,8	1,7	-	1,2	-
Ile	2,4	4,5	1	1,4	3,6	1,1	-	-
Leu	3,9	5	2,6	4	3,3	1,2	-	-
Phe	3,3	1,8	1,8	2,4	-	-	-	-
Hyl	2,5	2,2	-	-	0,6	-	-	-
Lys	5,4	4,3	1,7	2,5	2,7	-	-	-
Arg	8,5	11	4,3	5,9	6,5	3	3,6	1
Summe	174	168	100	99	111	42	39	6
Mg	17000	15000	9400	9400	9400	3800	3800	

1
2
3
4

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung der Hydroxylamin-Spalzprodukte des Peptids 2A.

Von dem Molekulargewicht und der Aminosäurezusammensetzung her bilden die zwei Peptide 2A-HA 2c und 2A-HA1a zusammen das Ausgangspeptid 2A.

Die Sequenzanalyse zeigte, daß das 111 Aminosäurerste große Peptid 2A-HA2c denselben N-Terminus wie das Ausgangspeptid 2A besitzt. Das Peptid 2A-HA2c ist also das N-terminale Fragment von 2A.

Da das Peptid 2A-HA1a alle Phenylalaninreste von 2A enthält und da kein Phenylalanin im N-terminalen Peptid 2A-HA2c vorhanden ist, kann das Peptid 2A-HA1a nur das C-terminale Fragment von 2A sein. Mit 174 Aminosäureresten überlappt es die chymotryptische Spalstelle zwischen C3 und C4 (Abb. 32).

Die Peptide 2A-HA2a und 2A-HA2b wurden nicht sequenziert, konnten deshalb noch nicht zugeordnet werden.

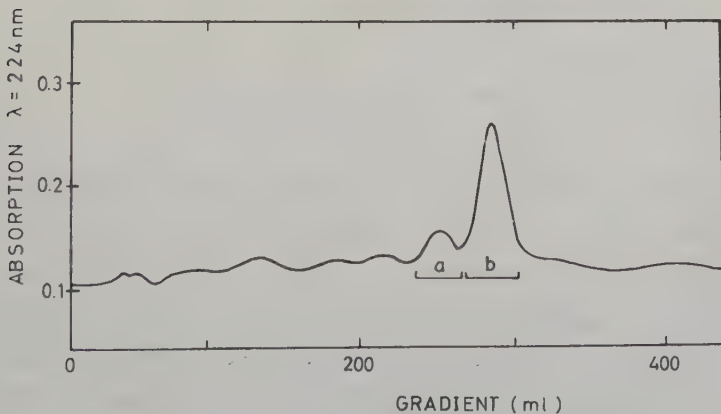


Abb. 25: Chromatographie der Fraktion 3 von Abb. 22 an Phosphocellulose mit einem Gradienten von 0 - 0,6 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 800 ml. Säule: 1,7 x 6 cm. Durchfluß 150 ml/h.

Fraktion 3: Die Fraktion 3 ergab durch Chromatographie an Phosphocellulose zwei Peptide 2A-HA3a und 2A-HA3b (Abb. 25), deren Molekulargewichte und Aminosäurezusammensetzung in Tabelle 6 angegeben sind. Diese Peptide wurden noch nicht sequenziert und ihre Zuordnung ist noch unklar.

Salzfraktion: In der Salzfraktion der Auftrennung des Hydroxylaminabbaues von 2A an Bio-Gel P-150 wurde ein Hexapeptid, 2A-HA4, gefunden, dessen Aminosäurezusammensetzung ebenfalls in Tab. 6 angegeben ist.

2. Hydroxylaminspaltung von Peptid 3B (C5-6-7).

50mg des chymotryptischen C-terminalen Peptids 3B von α 2-CB3,5 wurden mit Hydroxylamin gespalten. Die Trennung des Abbaugemisches erfolgte an Bio-Gel P-150 (Abb.26). Vier Fraktionen wurden gesammelt.

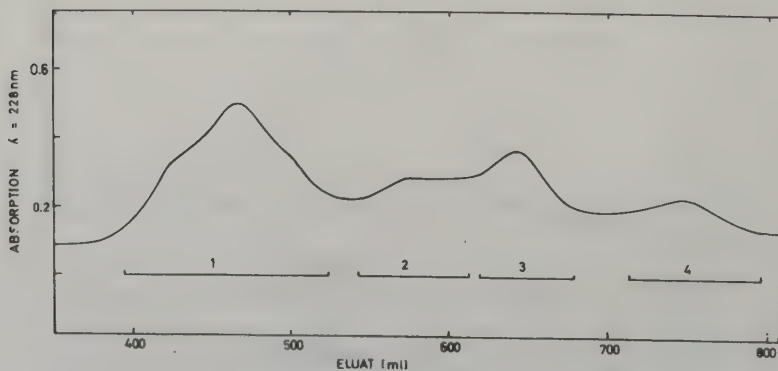


Abb. 26: Trennung der Hydroxylaminspaltprodukte von 3B an Bio-Gel P-150 unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 5. Aufgetragene Menge: 50 mg.

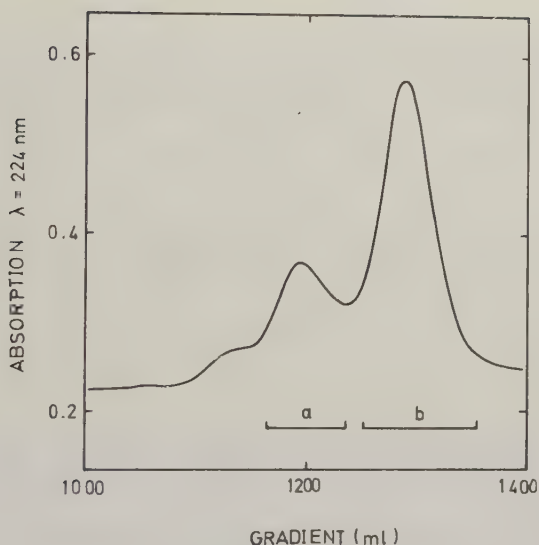


Abb. 27: Chromatographie der Fraktion 1 von Abb.26 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7.

Fraktion 1 :Die Chromatographie der Fraktion 1 an Phosphocellulose ergab zwei Peaks a und b (Abb.27). Peak a erwies sich als das ungespaltene Ausgangspeptid 3B. Peak b enthielt ein einheitliches Peptid, 3B-HA1b, mit dem Molekulargewicht 17800. Seiner Aminosäurezusammensetzung nach (Tab. 7) enthält das Peptid 3B-HA1b beide Tyrosinreste des Ausgangspeptids 3B. Da das Peptid 3B einen Tyrosinrest an seinem C-terminalen Ende besitzt (vgl. S. 35), stellt also das Peptid 3B-HA1b mit seinem 194 Resten das größte C-terminale Hydroxylaminfragment von 3B dar. Die N-terminale Sequenz von 3B-HA1b ist:

Gly-Ala-Hyp-Gly-Glu-Ala-Gly-Arg-Asp-Gly-Gln.

	3B-HA1b	3B-HA2a	3B-HA3	3B-HA4a	6A-HA1	6A-HA2
Hyp	16	7,4	6,6	7	5,5	1
Asp	14	8,6	2,7	3	0,3	3
Thr	-	-	-	-	1	-
Ser	6	0,8	3,5	2	-	-
Glu	13	6,4	5,8	2,5	7,5	-
Pro	26	11	15	3	4,4	1,3
Gly	65	32	29	17	17	4
Ala	20	8,2	8,8	4,3	5,5	3,4
Val	4,6	4,4	2,5	4	1,1	-
Ile	1,6	1,2	0,7	1	1	-
Leu	5,8	1,9	3	3,8	2,1	-
Tyr	1,7	0,6	0,8	-	-	-
Phe	1,0	-	1,4	0,5	2,1	-
Hyl	2,4	2,0	0,6	-	-	-
His	4,1	2,4	1,5	-	-	-
Lys	2,7	1,9	0,8	-	2,0	-
Arg	9,4	7,5	2,2	3	1,1	1,3
Summe	194	96	86	51	51	13

Tabelle 7: Aminosäurezusammensetzung der Hydroxylaminpeptide von 3B und 6A.

Fraktion 2 : Von der Fraktion 2 konnte ein Hauptpeptid, 3B-HA2a, durch Chromatographie an Phosphocellulose isoliert werden (Abb. 28). Die anderen Peptide, die entweder in geringen Mengen (Peak b) vorhanden war oder sich nur schwer trennen ließen (Peak c), wurden nicht weiter untersucht.

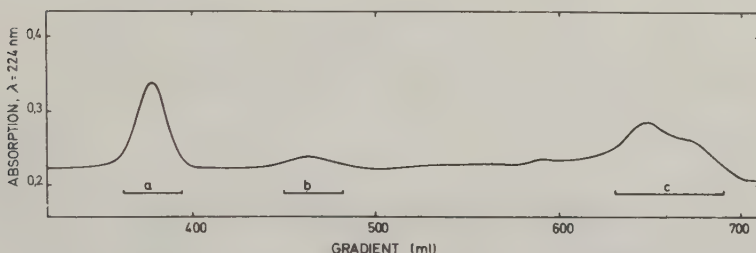


Abb. 28: Chromatographie der Fraktion 2 von Abb. 26 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7.

Das Molekulargewicht und die Aminosäurezusammensetzung des Peptids 3B-HA2a sind in Tab. 7 wiedergegeben. Seine N-terminale Sequenz wurde noch nicht bestimmt.

Fraktion 3: Die Fraktion 3 enthielt, wie die Chromatographie an Phosphocellulose zeigte, ein einheitliches Peptid 3B-HA3 (Abb. 29). Nach der Sequenzanalyse hat das Peptid 3B-HA3 eine N-terminale Sequenz (Gly-Leu-Gln-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-Ala), die ab Rest 3 mit der des Peptids 3B-4b identisch ist (vgl. S.44). Das Peptid 3B-HA3, das einen Tyrosin- und einen Phenylalaninrest enthält (Tab. 7), ist daher das C-terminale Fragment von 3B.

Fraktion 4 : Die Fraktion 4 ergab durch Chromatographie an Phosphocellulose einen Hauptpeak a und einen Nebenpeak b (Abb. 29). Der Nebenpeak wurde nicht weiter untersucht. Das Peptid im Hauptpeak, 3B-HA4a, hat das Molekulargewicht 4700. Seine Aminosäurezusammensetzung (Tab. 7) stimmt mit der der ersten 51 Reste der N-terminalen Sequenz des Peptids 3B überein, die mit einem Asparaginrest endet (vgl. Tab.10). Das Peptid 3B-HA4a stellt somit das N-terminale Fragment von 3B dar (Abb. 32).

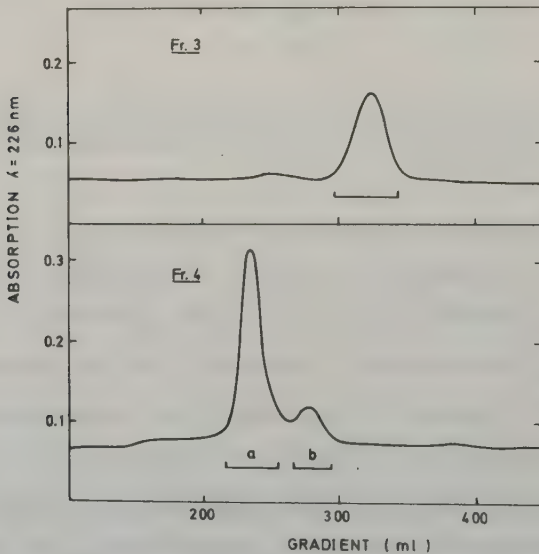


Abb. 29: Chromatographie der Fraktionen 3 und 4 von Abb. 26 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 25.

3. Hydroxylaminspaltung des Peptids 6A (C2).

20 mg des Peptids 6A wurden mit Hydroxylamin abgebaut.

Von der Auftrennung des Abbaugemisches an Bio-Gel

P-150 wurden drei Fraktionen gesammelt (Abb. 30).

Die 1. Fraktion enthielt hauptsächlich das ungespaltene Ausgangspeptid 6A.

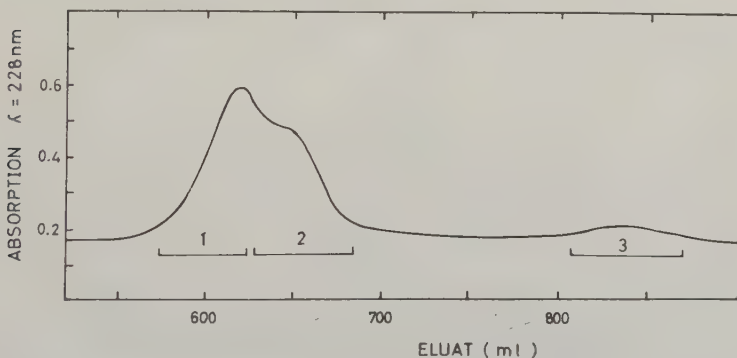


Abb. 30: Trennung der Hydroxylaminpeptide von 6A an Bio-Gel P-150 unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 5.

Das Haupthydroxylaminfragment von 6A, nämlich 6A-HA2,

befand sich in der Fraktion 2. Es wurde durch Chroma-

tographie an Phosphocellulose von ungespaltenem 6A

abgetrennt (Abb. 31), In Abb. 31 entspricht der Haupt-

peak a dem Peptid 6A-HA2 und der Nebenpeak b dem unge-

spaltenen 6A. Das Peptid 6A-HA2 hat ein Molekulargewicht

von 4800. Seine Aminosäurezusammensetzung ist in Tab. 7

angegeben.

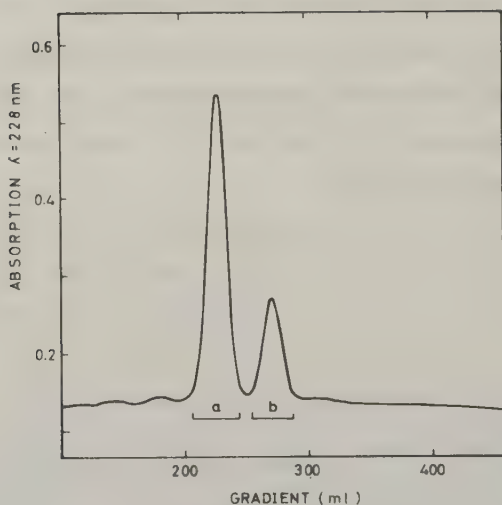


Abb. 31: Chromatographie der Fraktion 2 von Abb. 30 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 25.

Die 3. Fraktion enthielt ein Peptid mit dem Molekulargewicht 1200. Dieses Peptid, 6A-HA3, hat die gleiche Aminosäurezusammensetzung (Tab.7) wie das erwartete 13 Aminosäurereste große Hydroxylaminbruchstück, das durch Spaltung der Bindung Asn-Gly zwischen dem 13. und 14. Rest der N-terminalen Sequenz von 6A entstehen würde (vgl. S. 32).

Die Hydroxylaminspaltung vom Peptid 6A ergab also zwei Bruchstücke : ein N-terminales mit 13 Aminosäureresten und ein C-terminales mit 51 Resten. Letzteres ist von besonderem Interesse : seine Herstellung ist verhältnismäßig einfach und seine Sequenzierung wird erlauben, einen großen Teil der noch unbekannten Sequenz des Bereiches C2 aufzuklären.

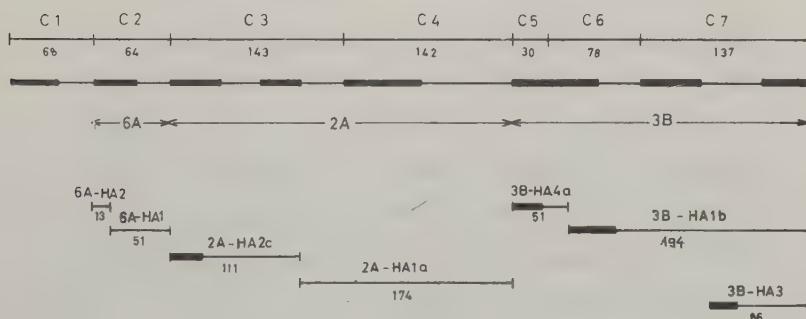


Abb. 32: Schematische Zuordnung der Hydroxylaminpeptide von 6A, 2A und 3B.

4. Diskussion.

Die Ausgangsmaterialien waren heterogen in Bezug auf ihre Empfindlichkeit gegen Hydroxylamin. Das Verhältnis von ungespaltenem zu gespaltenem Material änderte sich von Peptid zu Peptid. Beim Peptid 2A war die resistente Fraktion unbedeutend, beim Peptid 6A machte

sie schon mehr als 50 % des Ausgangsmaterials aus. Nach Bornstein [36] beruht dieser Unterschied auf dem Vorkommen der hydroxylaminempfindlichen Peptidbindung in den folgenden zwei verschiedenen Formen:



Asparaginyglycyl

Cyclisches Imid

Die empfindliche Form ist das cyclische Imid.

Außer einigen Fragmenten des Peptids 2A, die noch nicht zugeordnet werden konnten, sind die anderen Hydroxylaminfragmente zugeordnet (Abb. 32). Sie überlappen teilweise chymotryptische Spaltstellen und leisten daher Hilfe bei der Aufklärung der Sequenz der Peptide 6A, 2A und 3B.

V. SEQUENZANALYSE DES PEPTIDS 3B (C5-6-7).

1. Trypsinspaltung

Für die vollständige Aufklärung der Sequenz war es notwendig, neben den chymotryptischen Peptiden und Hydroxylaminpeptiden auch die tryptischen Peptide zu isolieren, um die nötigen Überlappungspeptide zu haben und die Bereiche sequenzieren zu können, die mit den anderen Peptiden nicht erhalten wurden. Außerdem diente Ihre Aminosäurezusammensetzung als

Bestätigung für die sequenzierten Bereiche.

Trypsin spaltet spezifisch Peptidbindungen Arg-X und Lys-X, wobei X jede Aminosäure außer Prolin und Hydroxyprolin sein kann. Da der Gehalt an Arginin und Lysin im Kollagen hoch ist, ist die Zahl von Spaltstücken ziemlich groß, und wir haben mit Peptiden von 3 bis 32 Aminosäureresten zu tun. Außer des C-terminalen Peptids haben die anderen tryptischen Peptide immer einen Arginin- bzw. Lysinrest am C-terminalen Ende.

Für die Isolierung der tryptischen Peptide wurde eine Kombination von Molekularsieb- (Bio-Gel P-4) und Ionenaustauscherchromatographie (Phosphocellulose) angewandt. Da die Struktur der kleinen Peptide stärker in die Molekularsieben eingeht, liefert die Molekulargewichtsbestimmung durch diese Methode nur grobe Abschätzungen. Die genaue Aminosäurerestzahl wurde berechnet, in dem der Analysenwert für Arginin bzw. Lysin als 1 Einheit angenommen wurde.

Für die Trypsinspaltung des Peptids 3B (C5-6-7) wurden insgesamt 60 mg Peptid verwendet. Da das Peptid 3B zwölf Arginin-, drei Lysin- und zwei Hydroxylysinreste enthält, konnte man 18 Peptide erwarten. Das Abbaugemisch wurde zuerst an Bio-Gel P-4 aufgetrennt und anschließend die Fraktionen an Phosphocellulose und wieder an Bio-Gel P-4 rechromatographiert. Die isolierten Peptide wurden durch Aminosäure- und Sequenzanalyse charakterisiert und größtenteils zugeordnet.

Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse zeigen Tabellen 8 und 9. Die Sequenzen sind in Tab. 10 angegeben. Von der Auftrennung an Bio-Gel P-4 des tryptischen Abbaugemisches von 3B wurden fünf Fraktionen gesammelt (Abb. 33).

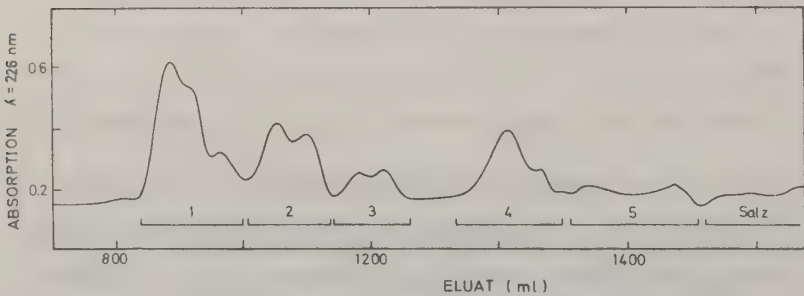


Abb. 33: Trennung des tryptischen Abbaugemisches von 3B an Bio-Gel P-4 in 0,1 m Essigsäure. Säule: 4 x 148 cm. Aufgetragene Menge: 30 mg.

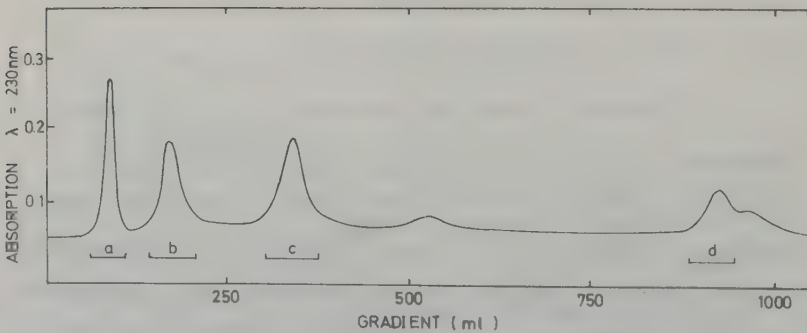


Abb. 34: Chromatographie der Fraktion 1 von Abb. 33 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 7.

Aus der Fraktion 1 wurden durch Chromatographie an Phosphocellulose vier Peptide 1a, 1b, 1c und 1d isoliert (Abb. 34). Sie erwiesen sich bei Rechromatographie an Bio-Gel P-4 als einheitlich (Tab. 8).

Die Chromatographie der Fraktion 2 an Phosphocellulose zeigte zwei Peaks, 2a und 2b (Abb. 35a). Die Rechromatographie an Bio-Gel P-4 ergab von Peak 2a ein einheitliches Peptid, das sich der Aminosäurezusammensetzung

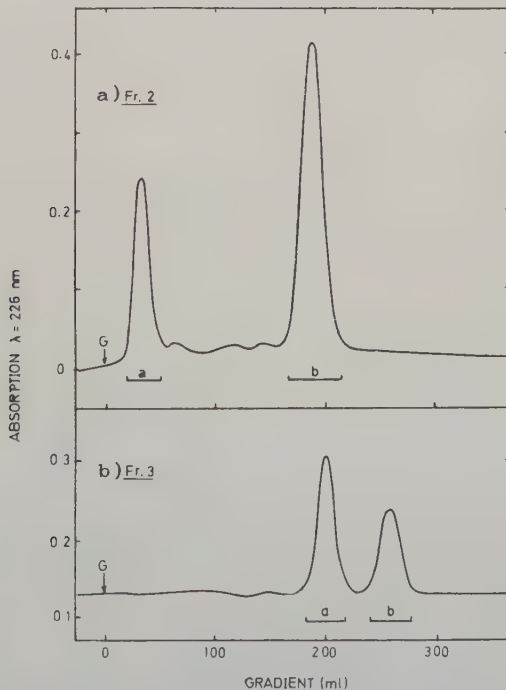


Abb. 35: Chromatographie der Fraktionen 2 und 3 von Abb. 33 unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 25

	1a	1b	1c	1d	2b1	2b2	3a	3b
Hyp	3,7	3,2	2,8	1,6	1,2	0,9	0,7	-
Asp	0,6	-	1,1	2,0	-	3,9	-	-
Ser	2,8	1,3	-	-	-	-	-	1,3
Glu	3,0	0,9	1,2	2,1	0,8	1,5	1,2	-
Pro	7,5	2,2	4,1	3,4	3,1	1,7	2,5	3,0
Gly	11	8	9	10	6	7	5	4
Ala	1,3	3,4	3,1	4,2	4,1	2,3	3,4	2,1
Val	-	1,8	3,2	0,9	2,5	2,4	1,8	-
Ile	-	0,8	-	-	-	-	1,2	-
Leu	-	2,1	-	3,3	-	-	-	-
Tyr	0,7	-	0,9	-	-	-	-	-
Phe	1,2	-	-	-	-	-	-	-
Hyl	-	-	-	-	-	-	-	-
His	-	-	-	1,8	-	-	-	-
Lys	-	-	1,2	-	-	-	-	0,8
Arg	-	1	-	1	1	1	1	-
Summe	32	24	26	30	18	20	16	11

Tabelle 8 : Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide 1a, 1b, 1c, 1d, 2b1, 2b2, 3a und 3b.

nach als identisch mit dem oben beschriebenen Peptid 1a erwies, und von Peak 2b zwei einheitliche Peptide 2b1 und 2b2 (Tab. 8).

Aus der Fraktion 3 wurden zwei Peptide 3a und 3b durch Chromatographie an Phosphocellulose erhalten (Abb. 35b, Tab. 8).

Die Chromatographie der Fraktion 4 an Phosphocellulose zeigte fünf Peaks (Abb. 36). Die Rechromatographie an Bio-Gel P-4 ergab von Peaks 4a, 4b und 4d je ein einheitliches Peptid, und von Peaks 4c und 4e je zwei Peptide, nämlich 4c1, 4c2 und 4e1, 4e2 (Tab. 9).

Aus der Fraktion 5 wurden drei Peptide 5a, 5b und 5c isoliert (Abb. 37). Sie sind kleine Peptide von zwei bzw. vier Aminosäureresten (Tab. 9).

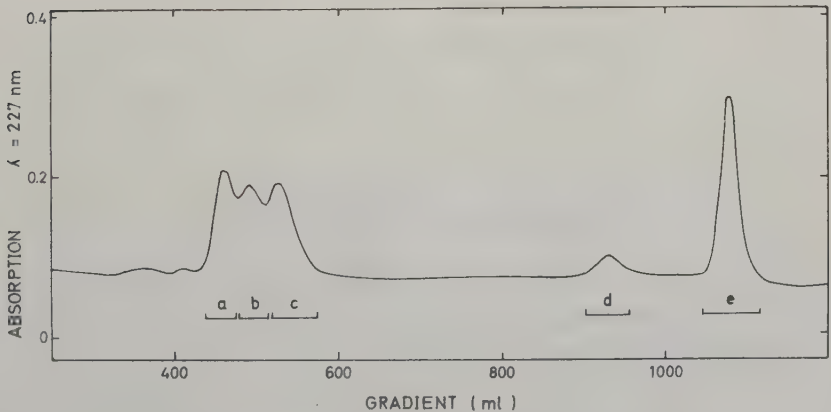


Abb. 36: Chromatographie der Fraktion 4 von Abb. 33 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 25.

	4a	4b	4c1	4c2	4d	4e1	4e2	5a	5b	5c
Hyp	2,1	2,3	-	-	1,3	0,9	1,4	-	-	-
Asp	-	3,3	-	1,2	0,9	2,6	1,3	1,4	1,2	-
Ser	0,7	-	1,1	-	-	-	0,4	-	-	-
Glu	-	0,8	1,3	-	1,0	1,2	2,1	-	-	1,2
Pro	-	1,4	2,3	-	-	1,3	-	-	-	-
Gly	4	4	3	1	2	4	3	1	1	1
Ala	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-
Leu	2,3	-	-	0,7	-	-	-	1,3	-	-
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hy1	-	-	-	0,9	-	1,5	-	-	-	-
His	-	-	-	-	0,8	-	1,2	-	-	-
Lys	-	-	-	-	1,0	1,0	1,1	-	-	-
Arg	1	1	1	-	-	0,5	1	1	1	1
Summe	12	12	9	4	7	12	10	4	3	3

Tabelle 9: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide 4a, 4b, 4c1, 4c2, 5a, 5b und 5c.

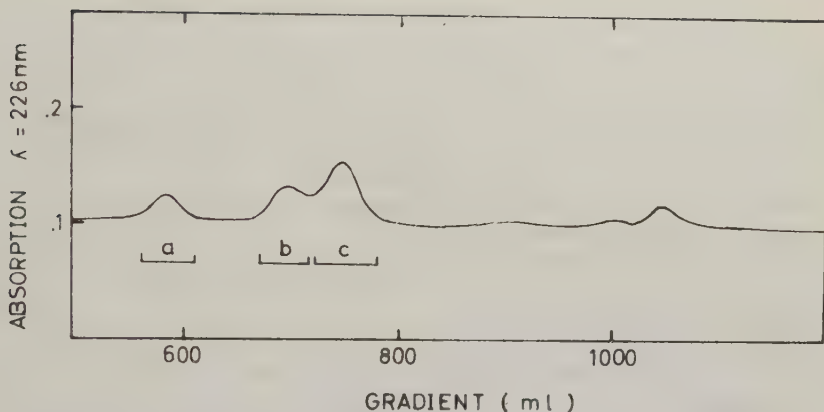


Abb. 37: Chromatographie der Fraktion 5 von Abb. 33 an Phosphocellulose unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 25.

2. Zuordnung der tryptischen Peptide.-Partielle Sequenzanalyse von Peptid 3B.

Die durch Sequenzanalyse der Chymotrypsin- und Hydroxylaminpeptide erhaltenen Daten erlauben die Zuordnung einiger tryptischen Peptide. Die Sequenzierung der tryptischen Peptide ermöglichte die Zuordnung weiterer Peptide. Für die verbleibenden ließ sich aus den vorhandenen Daten eine Zuordnung zur Peptidkette wahrscheinlich machen.

Tabelle 10 wiedergibt die Sequenz von 245 Aminosäurereste großem Peptid 3B.

Abbildung 38 stellt eine schematische Zuordnung der tryptischen Peptide dar.

10
 Gly-Ala-Hyp-Gly-Phe-Leu-Gly-Leu-Hyp-Gly-Ser-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-Val-Ala-Gly-Val-Ser-
 3B
 30
 Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Asn-Val-Gly-Asn-Hyp-
 3B
 3B-1
 2b2
 50
 Gly-Val-Asn-Gly-Ala-Hyp-Gly-Glu-Ala-Gly-Arg-Asp-Gly-Asn-Hyp-Gly-Asn-Asp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Arg-Asp-
 3B
 3B-1
 2b2
 3B-HA1b
 4b
 4d
 4e2
 80
 Gly-Gln-Hyp-Gly-His-Lys-Gly-Glu-Arg-Gly-Tyr-Hyp-Gly-Asn-Ala-Gly, Glu, Val, Gly, Ala, Val, Gly, Pro, Hyp,
 4d
 4e2
 5c
 100
 Gly, Pro, Ala, Gly, Pro, Val, Gly, Pro, Hyp, Gly-Lys-Leu-Gly-Asn-Arg-Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Val-
 4C (3B-2)
 2b1
 130
 Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Arg-Gly-Asp-Asp-Gly-Glu-Hyp-
 3B-2
 2b1
 4c1
 4e1
 150
 Gly-Asp-Lys-Gly-Asp, Hyl, Gly, Leu, Hyl, Gly, Asp, Arg-Gly-His-Asn-Gly-Leu-Gln-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-Ala-
 3B-2
 4e1
 1d
 3B-HA3
 3B-4b
 170
 Gly-His-His-Gly-Asp-Gln-Gly-Ala-Hyp-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ser-
 3B-HA3
 3B-4b
 3b
 200
 Gly-Pro-Ala-Gly-Lys-Ile-Gly-Gln-Hyp-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Ala-Gly, Ala, Val, Gly, Pro, Arg, Gly-Ser-Gln-
 3b
 3a
 1a
 220
 Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Pro-Ser-Gly-Gly-
 1a
 Tyr-Glu-Phe-Gly-Ser
 1a

Tabelle 10: Aminosäuresequenz des C-terminalen chymotryptischen Peptids 3B (C5-6-7) von Q2-CB3,5.

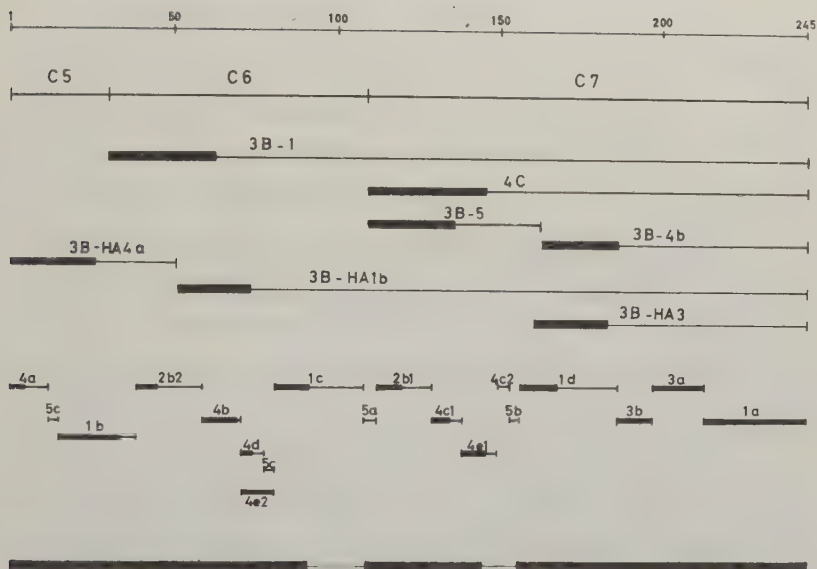


Abb. 38: Schematische Zuordnung der tryptischen Peptide von 3B mit sequenzierten Bereichen (■) von verschiedenen chymotryptischen, Hydroxylamin- und tryptischen Peptiden.

Die Sequenzierung der N-terminalen Bereiche der Peptide 3B, 3B-1, 3B-HA4a und 3B-HA1b etablierte die Aminosäuresequenz von Position 1 bis 74 (Tab. 10). In diesen Bereich passen die tryptischen Peptide 4a, 5c, 1b, 2b2, 4b, 4d und 5c. Diesen Peptiden kann sich nur das tyrosinhaltige Peptid 1c anschließen (wie ein Trypsinabbau von C5-6 bestätigt), welches bisher nur in den ersten 11 Aminosäureresten bekannt ist. Damit bis auf einen Leucinrest der Bereich C5-6 abgedeckt. Positionen 109 bis 146

wurden durch Sequenzierung der Peptide 4C und 3B-5 bestimmt. Das tryptische Peptid 5a sollte nach seiner Aminosäurezusammensetzung das Überlappungspeptid zwischen C5-6 und C7 bilden. Die tryptischen Peptide 2b1, 4c1 und 4e1 passen wiederum in den sequenzierten Bereich von Position 109 bis 146 hinein. Die Sequenzierung von Peptiden 3B-HA3, 3B-4b und 1d erweiterte die Sequenz von Position 157 bis 186.

Der Bereich zwischen Position 148 und 156 ist noch nicht aufgeklärt (Peptide 4c2 und 5b).

Der Bereich zwischen Position 187 und dem C-terminalen Ende wird wahrscheinlich von den noch verbleibenden tryptischen Peptiden 3b, 3a und 1a abgedeckt. Peptid 3b endet in einer X-Position und peptid 3a beginnt mit einer Y-Position der Tripletteinheit Gly-X-Y. Nur bei dieser Reihenfolge der Peptide wird die Tripletstruktur erhalten. Das Peptid 1a ist wegen seines Mangels an Arginin und Lysin als C-terminales Peptid identifiziert.

Von den isolierten tryptischen Peptiden wurden 4c2, 5a und 5b bisher nicht sequenziert. Wahrscheinlich repräsentieren 4c2 und 5b die Positionen 150 bis 156.

Das Peptid 4e2 ist ein Doppelpeptid, das zwei Peptide 4d und 5c umfaßt.

E. DISKUSSION

Das Ziel des Arbeitskreises ist die vollständige Aufklärung der Primärstruktur des Kalbshautkollagens vom Typ I. Bis auf kurze Bereiche des $\alpha 1$ -CB8 wurde die $\alpha 1$ -Kette vollständig aufgeklärt. Von der $\alpha 2$ -Kette sind die Bromcyanpeptide $\alpha 2$ -CB1, $\alpha 2$ -CB0, $\alpha 2$ -CB4, und $\alpha 2$ -CB2 bekannt und damit ist die Sequenz der ersten 366 Aminosäurereste aufgeklärt. Für die komplette Primärstruktur fehlte noch die Sequenz des größten C-terminalen Bromcyanpeptids $\alpha 2$ -CB3,5 mit 662 Resten. Zu diesem Zweck war es notwendig, das Ausgangsmaterial in großen Mengen zur Verfügung zu haben und in sequenzierbare Peptide zu fragmentieren.

Die Benutzung des säurelöslichen bzw. neutralsalzlöslichen Kollagen anstelle der isolierten $\alpha 2$ -Kette als Ausgangsmaterial für den Bromcyanabbau ersparte einen Trennungsschritt an CM-Cellulose. Das Endergebnis unterschied sich nicht, ob man von SLK bzw. NLK oder von $\alpha 2$ -Ketten ausging. Die Adaptation des Trennverfahrens von klein dimensionierten auf groß dimensionierte Säulen verkürzte die Zeitaufwand um etwa das 10-fache.

Für die Fragmentierung von $\alpha 2$ -CB3,5 wurde das Enzym Chymotrypsin benutzt, das sich bei der Strukturaufklärung der Bromcyanpeptide der $\alpha 1$ -Kette und des $\alpha 2$ -CB4 als sehr

nützlich erwiesen hatte. Als beste Abbaubedingungen wurden 2 min. bei 37 C mit einem Enzym/Substrat- Verhältnis von 1 / 50 gefunden. Unter diesen Bedingungen erhält man eine Mischung mit einer begrenzten Anzahl von relativ leicht trennbaren Peptiden. Eine längere Inkubationszeit (zB. 40 min.) führt zu einem Peptidgemisch, dessen Trennung äußert schwierig und arbeitsaufwendig ist. Die 2-minutige Spaltung von $\alpha 2$ -CB3,5 führte zur Bildung von hauptsächlich vier Fragmenten (C1, C2, C3-4 und C5-6-7), deren Summe der Molekulargewichte und der Aminosäurezusammensetzung der des Peptides $\alpha 2$ -CB3,5 entspricht.

Neben diesen drei chymotrypsinempfindlichen Peptidbindungen gibt es noch andere, weniger empfindliche Spaltstellen, welche die Ursache für das Auftreten weiterer Fragmente sind. Diese Tatsache wurde ausgenutzt, um noch kleinere Fragmente des großen Peptids C5-6-7 herzustellen. Durch 8-minutige Inkubation mit Chymotrypsin wurden von C5-6-7 elf Peptide gebildet. Diese wurden ebenfalls isoliert und charakterisiert.

Die Zuordnung der Chymotryptischen Fragmente von $\alpha 2$ -CB3,5 wurde mittels ihrer Aminosäurezusammensetzung und durch Vergleich ihrer N-terminalen Sequenzen mit denen der Kollagenasefragmente $\alpha 2(190)$, $\alpha 2(125)$ und $\alpha 2(78)$, deren genaue Lokalisation bekannt war, durchgeführt.

Für die Aufklärung der Sequenz war es notwendig, noch andere Peptide herzustellen, weil unter optimalen Bedingungen (hohe Reinheit und genügende Menge des zu sequenzierenden Peptids) der automatisierte Edman-Abbau eine N-terminale Sequenz von ungefähr 30 bis 40 Aminosäureresten ermitteln kann. Als alternative Methode hat sich die Hydroxylaminspaltung angeboten, die sich bei der Aufklärung von α 1-CB8, α 1-CB7 und α 1-CB4 als erfolgreich erwiesen hatte. Die Hydroxylaminspaltung, am ganzen Peptid α 2-CB3,5 angewandt, ergab ein Peptidgemisch, welches sich als schwer trennbar erwies. Wurden dagegen die chymotryptischen Hauptspaltprodukte von α 2-CB3,5 als Ausgangsmaterial für die Spaltung benutzt, konnten relativ einfach einheitliche Fragmente isoliert werden. Diese Fragmentierungsmethode wurde an den Peptiden C2, C3-4 und C5-6-7 angewandt.

Von den Peptiden C2 und C3-4 wurden jeweils zwei und vom Peptid C5-6-7 drei Hauptfragmente isoliert, die zusammen jeweils dem Ausgangsmaterial entsprachen.

Die chymotryptischen Peptide aus 2- und 8-minütiger Spaltung und die Hydroxylaminpeptide reichten nicht aus, um alle Bereiche des Peptids C5-6-7 zu sequenzieren. Deswegen wurden von diesem C-terminalen chymotryptischen Peptid zusätzlich noch alle tryptische Peptide isoliert und sequenziert.

Mit diesen Daten war es möglich, fast die gesamte Sequenz des Peptids C5-6-7 abzuleiten. Nicht eindeutig geklärt wurden bisher zwei Bereiche mit 15 bzw. 9 Aminosäureresten. In weiteren Bereichen muß noch die Zuordnung durch überlappende Peptide bestätigt werden. Die vollständige Aufklärung dieser Regionen wird durch Isolierung zusätzlicher chymotryptischer Peptide oder durch Kollagenasefragmente möglich sein. Wie in Abb. 12 und 13 gezeigt, gibt es noch eine Reihe kleiner chymotryptischer Spaltprodukte, die bisher nicht isoliert und charakterisiert worden sind. Auf der anderen Seite erscheint die Anwendung von Kollagenase sinnvoll, da die gesuchte Bereiche keine kollagenase-empfindliche Peptidbindungen enthalten.

Die oben beschriebene Sequenzanalyse von C5-6-7 hat gezeigt, daß neben der Verwendung von Chymotrypsin und Hydroxylamin zur Darstellung größerer Fragmente die Isolierung tryptischer Peptide eine wesentliche Ergänzung zur Strukturaufklärung darstellt. Man kann daher annehmen, daß der hier eingeschlagene Weg auch bei der Aufklärung von C1, C2, und C3-4 erfolgreich sein wird.

Insgesamt sind jetzt etwa 400 Aminosäurereste vom Peptid $\alpha 2$ -CB3,5 aufgeklärt. Diese Daten zeigen, daß auch in diesem Bereich der $\alpha 2$ -Kette die schon in anderen Bereichen gefundenen Strukturprinzipien wiederkehren. Tab. 11 zeigt die bisher sequenzierten Bereiche von $\alpha 2$ -CB3,5 mit entsprechenden Bereichen der $\alpha 1$ -Kette.

Tabelle 11: sequenzierte Bereiche des Peptids Q2-CB3,5 mit entsprechenden Bereichen der Q1-Kette. Die angegebenen Zahlen sind die Nummern der Aminosäurereste der Q1-Kette, gezählt vom Anfang des helikalen Bereiches.

	360		370
d1	Gly-Ala-Lys-Gly-Leu-Thr-Gly-Ser-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Pro-Asp-Gly-Lys-Thr-Gly-Pro-Hyp-		
d2	Gly-Pro-Arg-Gly-Phe-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Asn-Ile-Gly-Pro-Ala-Gly-Lys-Glu-Gly-Pro-Val-		
	←		→
		C1	
	380		390
d1	Gly-Pro-Ala-Gly-Glx-Asx-Gly-Arg-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp- . . . -Hyp-Gly-Ala-Val-		
d2	Gly-Leu-Hyp-Gly-Ile-Asp-Gly-Arg-Pro-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Ala- . . . -Ala-Gly-Ala-Arg-		
	←		→
		C1	C2
	430		440
d1	Gly-Pro-Ala-Gly-Lys-Asp-Gly-Glu-Ala-Gly-Ala-Gln-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-		450
d2	Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Asp-Gly-Asn-Asn-Gly-Ala-Gln-Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Gln-Gly-Val-Gln-		
	←		→
		C2	
	490		500
d1	. . . -Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-		
d2	. . . -Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-		
	→		←
		C3	
	510		520
d1	Val-Glu-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Ala-Asn-Gly-Ala-Hyp-Gly-Asn-Asp-Gly-		
d2	Ala-Ala-Gly-Pro-Thr-Gly-Pro-Ile-Gly-Ser-Arg-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Asp-Gly-		
	←		→
		C3	
	530		640
d1	Ala-Lys-Gly-Asp-Ala-Gly- . . . -Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Asp-Gly-Gln-Hyp-Gly-Ala-Lys-		
d2	Ala-Lys-Gly-Glu-Ala-Gly- . . . -Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly-Gln-Hyp-Gly-Ala-Hyl-		
	→		←
		C4	
	650		660
d1	Gly-Glu-Hyp-Gly-Asp-Ala-Gly-Ala-Lys-Gly-Asp-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-		
d2	Gly-Glu-Arg-Gly-Thr-Lys-Gly-Pro-Val-Gly-Glu-Gln-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Val-		
	←		→
		C4	
	670		780
d1	Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ile-Gly- . . . -Gly-Gln-Arg-Gly-Val-Val-Gly-Leu-Hyp-Gly-Gln-Arg-		
d2	Gly-Ala-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly- . . . -Gly-Ala-Hyp-Gly-Phe-Leu-Gly-Leu-Hyp-Gly-Ser-Arg-		
	→		←
		C5	
	790		800
d1	Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Ser-Gly-Glu-Hyp-Gly-Lys-Gln-Gly-Pro-Ser-		
d2	Gly-Glu-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-Val-Ala-Gly-Ser-Val-Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-		
	←		→
		C5	
	810		820
d1	Gly-Ala-Ser-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Ala-Gly-Pro-Hyp-		
d2	Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Asn-Val-Gly-Asn-Hyp-Gly-Val-Asn-Gly-Ala-Hyp-		
	←		→
		C6	
	830		840
d1	Gly-Glu-Ser-Gly-Arg-Glu-Gly-Ala-Hyp-Gly-Ala-Glu-Gly-Ser-Hyp-Gly-Arg-Asp-Gly-Ser-Hyp-		
d2	Gly-Glu-Ala-Gly-Arg-Asp-Gly-Asn-Hyp-Gly-Asn-Asp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Arg-Asp-Gly-Gln-Hyp-		
	←		→
		C6	

	850	860	880
d1	Gly-Ala-Lys-Gly-Asp-Arg-Gly-Glu-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-		-Gly-Lys-
d2	Gly-His-Lys-Gly-Glu-Arg-Gly-Tyr-Hyp-Gly-Asn-Ala-Gly-Glu-Val-Gly-Ala-		-Gly-Lys-
	C6		

	890	900
d1	Ser-Gly-Asp-Arg-Gly-Glu-Thr-Pro-Ala-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-	
d2	Leu-Gly-Asn-Arg-Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-	
	C7	

	910	920
d1	Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Arg-Gly-Asp-Hyl-Gly-Glx-Thr-Gly-Glx-Glx-Gly-Asp-	
d2	Arg-Gly-pro-Ser-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Arg-Gly-Asp-Asp-Gly-Glu-Hyp-Gly-Asp-Lys-Gly-Hyl-	
	C7	

	930	940
d1	-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Glu-Gln-	
d2	-Arg-Gly-His-Asn-Gly-Leu-Gln-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-Ala-Gly-His-His-Gly-Asp-Gln-	
	C7	

	950	960
d1	Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ser-Ala-Gly-Ser-Hyp-	
d2	Gly-Ala-Hyp-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Ala-	
	C7	

	970	980	990
d1	Gly-Lys-Asp-Gly-Leu-Asn-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Ile-		-Gly-Arg-Thr-Gly-Asp-Ala-Gly-
d2	Gly-Lys-Ile-Gly-Gln-Hyp-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Ala-		-Gly-Ser-Gln-Gly-Ser-Gln-Gly-
	C7		

	1000	1010
d1	Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Pro-Ser-Gly-Gly-Tyr-	
d2	Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Pro-Ser-Gly-Gly-Tyr-	
	C7	

d1	Asp-Leu-Ser-Phe
d2	Glu-Phe-Gly-Ser
	→

So zeigen einige Aminosäuren eine ungleiche Verteilung auf die X- und Y-Position der Tripletteinheit Gly-X-Y. Phenylalanin ist im helikalen Teil immer in der X-Position. Während Leucin in der $\alpha 1$ -Kette fast immer in der X-Position auftritt, werden in $\alpha 2$ -CB $\bar{3}$, $\bar{5}$ bisher von 12 Leucinresten 3 in der Y-Position gefunden. Threonin ist in C5-6-7 überhaupt nicht vorhanden. Lysin und Asparaginsäure sind fast gleichmäßig auf die beiden Positionen verteilt. Dagegen besetzt Glutaminsäure bevorzugt die X- und Arginin bevorzugt die Y- Position. Es wurde gezeigt [44, 45], daß die Seitenkette bestimmter Aminosäuren mit dem Rückgrat der Helix Wasserstoffbrückenbindungen bilden können, was einen zusätzlichen Beitrag zur Stabilität der Tripelhelix bedeutet. Dies könnte die ungleiche Verteilung bestimmter Aminosäuren auf die X- und Y- Position erklären. Glutamin kann z.B. von der Y- Position, die es bevorzugt besetzt, durch seine Seitenkette eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe der Peptidkette bilden. Asparagin dagegen, dessen Seitenkette für diese Wechselwirkung zu kurz ist, ist in Übereinstimmung damit gleichmäßig zwischen der X- und Y- Position verteilt. Die Nicht-Equivalenz der X- und Y- Position ist auch bei der Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin und von Lysin zu Hydroxylysin ersichtlich. Diese beiden Aminosäuren werden nur in der Y- Position hydroxyliert.

Prolin und Hydroxyprolin sind wesentlich für die Stabilität der Tripelhelix verantwortlich. Die Art, wie Prolin und Hydroxyprolin auf die drei möglichen Triplets Gly-X-Hyp, Gly-Pro-Y, und Gly-Pro-Hyp verteilt sind, die in unterschiedlichen Maßen die Helix stabilisieren, wird aber bis jetzt noch nicht verstanden. Eine besonders stabile Region ist am C- Terminus der $\alpha 2$ -Kette gefunden worden, wo fünf Triplets Gly-Pro-Hyp und Gly-Pro-Pro aufeinander folgen. Eine identische Sequenz wird auch in der entsprechenden Region der $\alpha 1$ -Kette angetroffen.

Der hier ermittelte Sequenzbereich läßt schon einen Vergleich mit den korrespondierenden Bereichen der $\alpha 1(I)$ -Kette vom Kalbshautkollagen zu. Dabei ist am auffallendsten, daß die Positionen, die in der $\alpha 1$ -Kette durch Asparaginsäure und Glutaminsäure bzw. Lysin und Arginin besetzt sind, auch in der $\alpha 2$ -Kette durch solche besetzt werden. Zwar gibt es zwischen der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette Austausch des Typs Asp gegen Glu bzw. Lys gegen Arg, aber diese bedeuten keine wesentliche Änderung des polaren Charakters dieser Bereiche der Kette. Vergleichsweise selten wird der Austausch einer polaren gegen eine apolare Aminosäure gefunden.

Die anderen Aminosäuren werden alle wesentlich häufiger ausgetauscht. Wird Glycin nicht mitberechnet, dann wird im Durchschnitt jeder zweite Aminosäurerest in der $\alpha 2$ -

Kette im Vergleich zur $\alpha 1$ -Kette ausgetauscht, wobei die Gesamtzahl der Substitutionen in der X- und Y-Position etwa gleich groß ist. Die Substitutionshäufigkeit ist unterschiedlich entlang der Peptidkette. Es wird ein Alternieren von kurzen identischen mit kurzen differenten Bereichen gefunden.

Es ist bekannt, daß die polaren Aminosäuren und die Aminosäuren mit hydrophober Seitengruppe für die geordnete Aggregation von Kollagenmolekülen zu Fibrillen eine wichtige Rolle spielen. Bisher wird aber die Rolle der einzelnen Aminosäuren und ihre Verteilung entlang der Peptidkette bei der Aggregation von Molekülen zu Mikrofibrillen und von Mikrofibrillen zu Fibrillen nur in Grundzügen verstanden. Dieses Problem ist gegenwärtig Gegenstand intensiver Untersuchung. Die Frage, welche Rolle die $\alpha 2$ -Kette in Typ I spielt, da alle andere Typen nur aus einer Art von α -Ketten bestehen, ist noch offen. Die vollständige Kenntnis der Sequenz der $\alpha 2$ -Kette wird eine Voraussetzung für diese Antwort sein.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode beschrieben, aus neutralsalzlöslichem und säurelöslichem Kollagen durch Bromcyanabbau grosse Mengen des Peptids $\alpha 2\text{-CB}_{3,5}$ herzustellen. Mit diesem Verfahren wurde die Grundlage für die Strukturanalyse dieses 662 Aminosäurereste enthaltenen Peptids geschaffen.

Eine 2-minutige Fragmentierung des Peptids $\alpha 2\text{-CB}_{3,5}$ mit Chymotrypsin führte zur Bildung von hauptsächlich vier Peptiden (C1 mit 68, C2 mit 64, C3-4 mit 285 und C5-6-7 mit 245 Aminosäureresten), die zusammen dem Ausgangsmaterial entsprachen. Daneben wurden acht Fragmente der beiden großen chymotryptischen Peptide C3-4 und C5-6-7 isoliert, durch Bestimmung ihrer Molekulargewichte, Aminosäurezusammensetzung und der N-terminalen Sequenz charakterisiert, und dem Peptid $\alpha 2\text{-CB}_{3,5}$ zugeordnet.

Eine 8-minutige Nachspaltung des C-terminalen Peptids C5-6-7 mit Chymotrypsin führte zur Bildung von elf Peptiden, die ebenfalls isoliert und charakterisiert wurden.

Die Hydroxylaminspaltung von C2, C3-4 und C5-6-7 wurde durchgeführt, um zusätzliche Fragmente des Peptids $\alpha 2\text{-CB}_{3,5}$ zu erhalten. Von den Peptiden C2 und C3-4 wurden jeweils zwei und vom Peptid C5-6-7 drei Hauptfragmente isoliert und charakterisiert. Die Summe der

Hauptfragmente entsprach jeweils dem Ausgangsmaterial. Die Hydroxylaminspaltung vom ganzen α 2-CB3,5 führte zu einem Peptidgemisch, dessen Auftrennung sich als praktisch nicht durchführbar und daher sinnlos erwies.

Die Sequenzierung der N-terminalen Bereiche der Chymotrypsin- und Hydroxylaminpeptide führte im Bereich von C1, C2 und C3-4 zur Etablierung von ungefähr 180 Aminosäureresten. Vom C-terminalen Peptid C5-6-7 wurden zusätzlich alle tryptische Peptide isoliert, charakterisiert und sequenziert. Dies führte zur fast vollständigen Aufklärung der Sequenz dieses Bereiches.

Die aufgeklärten Sequenzbereiche zeigen ähnliche Strukturprinzipien, wie sie für die α 1-Kette gefunden worden sind. Ein Vergleich mit dem korrespondierenden Bereich der α 1-Kette zeigt neben einer relativ großen Stabilität der Positionen mit geladenen Aminosäuren entlang der Peptidkette eine relativ hohe Austauschhäufigkeit der anderen Aminosäuren.

Die hier beschriebenen Peptide bilden die Grundlage für die Aufklärung der Sequenz der noch unbekannten Bereiche in den Peptiden C1, C2 und C3-4.

G. L I T E R A T U R

1. Ramachandran, G. N. und Kartha, G.
Nature 176 (1955), 593
2. Rich, A. und Crick, F. H. C.
Nature 176 (1955), 915
3. Ramachandran, G. N.
"Treatise on Collagen" (1967) Band 1, S. 103,
Academic Press, New York
4. Harrington, W. F. und von Hippel, P. H.
Adv. Prot. Chem. 16 (1961), 1
5. Josse, J. und Harrington, W. F.
J. Molec. Biol. 9 (1964), 289
6. Hodge, A. J. und Schmitt, F. O.
Proc. Nat. Sci. USA 46 (1960), 186
7. Furthmayr, H., Timpl, R., Stark, M., Lapière, C. M.
und Kühn, K.
FEBS Letters 28 (1972), 247
8. von der Mark, K. und Bornstein, P.
J. Biol. Chem. 248(1973), 2285
9. Jimenez, S. A., Dehm, P. und Prockop, D. J.
FEBS Letters 17 (1971), 245
10. Speakman, P. T.
Nature 229 (1971), 241
11. Bellamy, G. und Bornstein, P.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68 (1971), 1138
12. Lenaers, A., Ansay, M., Nusgens, B. V. und
Lapière, C. M.
Eur. J. Biochem. 23 (1971), 533
13. Lapière, C. M., Lenaers, A. und Kohn, L. P.
Pro. Nat. Acad. Sci. USA 68 (1971), 3048
14. Kang, a. H.
Biochemistry 11 (1972), 1828

15. Miller, E. J.
Clin. Ortho. 92 (1973), 260
16. Miller, E. J., Epstein, E. H., Jr. und Piez, K. A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 (1971), 1024
17. Chung, E. und Miller, E. J.
Science 183 (1974), 1200
18. Rauterberg, J. und Bassewitz, D.v.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356 (1975), 95
19. Epstein, E. H., Jr.
J. Biol. Chem. 249 (1974), 3225
20. Kefalides, N. A.
Int. Rev. Connective Tissue Research 6 (1973), 63
21. Bornstein, P. und Piez, K. A.
Biochemistry 5 (1966), 3460
22. Butler, W. T., Piez, K. A. und Bornstein, P.
Biochemistry 6 (1967), 3771
23. Rauterberg, J. und Kühn, K.
Eur. J. Biochem. 19 (1971), 398
24. Fietzek, P. P., Münch, M., Breitkreuz, D. und Kühn, K.
FEBS Letters 9 (1970), 229
25. Fietzek, P. P. und Kühn, K.
Topics in Current Chemistry 29 (1972), 1
26. Fietzek, P. P. und Kühn, K.
FEBS Letters 36 (1973), 289
27. Fietzek, P. P. und Kühn, K.
Eur. J. Biochem. (1975a) im Druck
28. Rauterberg, J., Fietzek, P. P., Rexrodt, F., Becker, U.
Stark, M. und Kühn, K.
FEBS Letters 21 (1972b), 75
29. Fietzek, P. P., Breitkreuz, K. und Kühn, K.
Biochem. Biophys. Acta 365 (1974 b), 305
30. Fietzek, P. P. und Rexrodt, F. W.
Eur. J. Biochem. (1975) im Druck
31. Fietzek, P. P., Furthmayr, H. und Kühn, K.
Eur. J. Biochem. 47 (1974 a), 257

32. Fietzek, P. P. und Breitkreuz, D.
in Vorbereitung
33. Hadjiargyriou, M. E.
Doktorarbeit, München 1974
34. Heidemann, E. und Heinrich, W.
Eur. J. Biochem. 14 (1970), 61
35. Kühn, K., Schupler, G. und Kühn, J.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 338 (1966), 10
36. Bornstein, P.
Biochemistry 9 (1970), 2408
37. Stark, M., Rauterberg, J. und Kühn, K.
FEBS Letters 13 (1971), 101
38. Piez, K. A.
Anal. Biochem. 26 (1968), 305
39. Keutmann, H. T. und Potts, J. T.
Anal. Biochem. 29 (1969), 175
40. Sanger, F. und Thompson, E. O. P.
Biochem. Biophys. Acta 71 (1963), 468
41. Spackman, D H., Stein, W. H. und Moore, S.
Anal. Chem. 30 (1958), 1190
42. Edman, P.
Protein Sequence Determination (Herausgeb. Needleman,
S. B.), S. 211, Springer 1970, Berlin-Heidelberg-
New York
43. Pisano, J. J. und bronzert, T. J.
Fed. Proc. 28 (1969), 661
44. Rauterberg, J. und Kühn, K.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349 (1968 b), 611
45. Salem, G. und Traub, W.
FEBS Letters (1975) im Druck

LEBENS LAUF

Am 1.1.1940 wurde ich als Sohn von Herrn Phan Ha Uyen und seiner Ehefrau Bui Thi Bich-Thao in Hue (Vietnam) geboren.

In Hue besuchte ich die Volksschule und das Gymnasium bis zum Abitur 1959.

Von 1959 bis 1965 studierte ich Physik und Chemie an der Universität Saigon und legte dort die Diplom-Haupt-Prüfung in Physik und Chemie.

Von 1965 bis 1970 arbeitete ich als wissenschaftlicher Assistent an der Chemischen Hochschule der Technischen Universität Saigon.

Ab Oktober 1970 studierte ich an der Universität München Lebensmittelchemie, die ich Ende 1972 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit April 1973 arbeite ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Kühn an der vorliegenden Dissertation.

Ich besitze die vietnamesische Staatsangehörigkeit.

